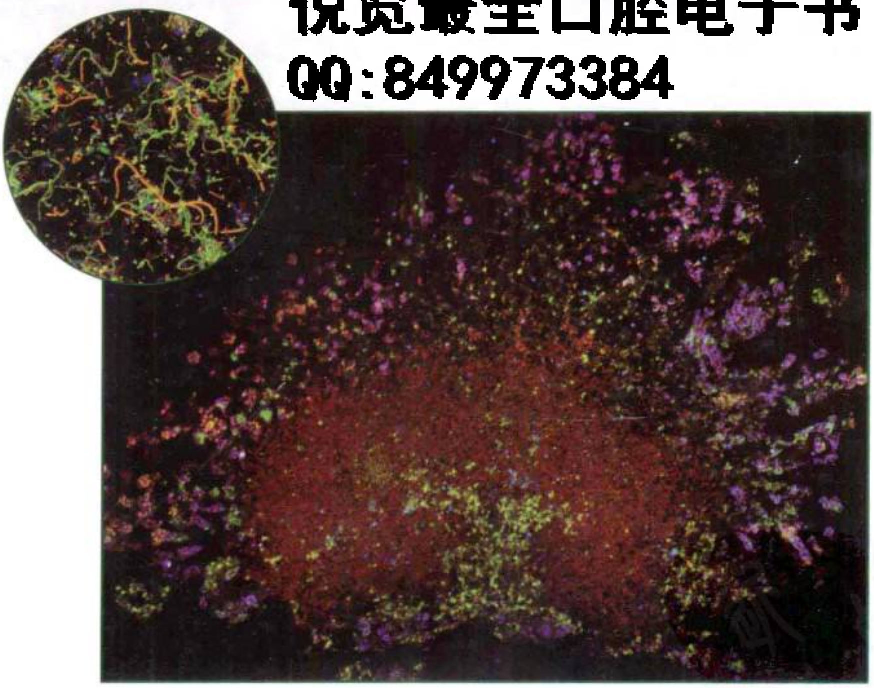
口腔微生态学

Oral Microecology

悦览最全口腔电子书
QQ:849973384



主 编　周学东　施文元

人民卫生出版社

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

VISIT…

LANZAROTE Caliente.com

悦览最全口腔电子书
QQ:849973384

销售分类/口腔医学 基础医学

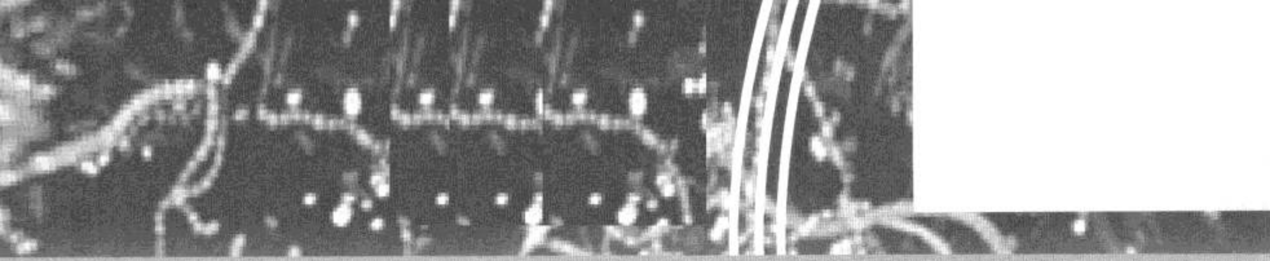
策划编辑 刘红霞
责任编辑 王 璐 刘红霞
封面设计 大漢方圓 赵京津
版式设计 陈 肮

人卫社官网 www.pmph.com 出版物查询，在线购书
人卫医学网 www.ipmph.com 医学考试辅导，医学数据库服务，医学教育资源，大众健康资讯

ISBN 978-7-117-17179-3

定 价：148.00 元

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



口腔微生态学

Oral Microecology

名誉主编　李兰娟　Neils Høiby　Paul E. Kolenbrander

主　　编　周学东　施文元

副 主 编　马晟利　贾文祥

主编助理　徐　欣　李　燕　李雨庆

编　　委（以姓氏笔画为序）

马晟利　王　智　王人可　尹　伟　朱　眲
李明云　李雨庆　李继遥　杨维青　杨德琴
肖丽英　肖晓蓉　肖　瑾　吴　红　何金枝
邹　玲　邹　静　宋志军　张　平　张　壮
张　岚　陈　晖　陈谦明　但红霞　金　鑫
周学东　周京琳　郑庆华　赵　蕾　郝玉庆
胡　涛　侯本祥　施文元　贾文祥　徐　屹
徐　欣　徐华焜　黄正蔚　黄定明　黄雪莲
梅　李　梁景平　程　然　程　磊　曾　昕
谢　轶　潘　剑　薛　晶　Hyun Koo　JM Ten Cate

人民卫生出版社

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

图书在版编目（CIP）数据

口腔微生态学/周学东，施文元主编．—北京：人民卫生出版社，2013

ISBN 978-7-117-17179-3

Ⅰ．①口… Ⅱ．①周… ②施… Ⅲ．①口腔科学-微生物生态学 Ⅳ．①R780.3

中国版本图书馆CIP数据核字（2013）第064671号

人卫社官网	www. pmph. com	出版物查询，在线购书
人卫医学网	www. ipmph. com	医学考试辅导，医学数据库服务，医学教育资源，大众健康资讯

版权所有，侵权必究！

口腔微生态学

主　　编：周学东　施文元
出版发行：人民卫生出版社（中继线 010-59780011）
地　　址：北京市朝阳区潘家园南里19号
邮　　编：100021
E - mail：pmph @ pmph. com
购书热线：010-59787592　010-59787584　010-65264830
印　　刷：北京人卫印刷厂
经　　销：新华书店
开　　本：787×1092　1/16　　印张：26
字　　数：633千字
版　　次：2013年7月第1版　2013年7月第1版第1次印刷
标准书号：ISBN 978-7-117-17179-3/R · 17180
定　　价：148.00元
打击盗版举报电话：010-59787491　E-mail：WQ @ pmph. com
（凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

编写人员

王人可　尹　伟　肖丽英　张　平　张　壮　但红霞　张　岚
李明云　何金枝　邹　玲　李继遥　李雨庆　肖晓蓉　陈谦明
邹　静　郑庆华　周学东　周京琳　金　鑫　郝玉庆　胡　涛
赵　蕾　贾文祥　徐　屹　徐　欣　梅　李　黄定明　黄雪莲
曾　昕　程　磊　程　然　潘　剑　薛　晶　谢　轶
（四川大学）

梁景平　黄正蔚　姜云涛　马　瑞　（上海交通大学）
陈　晖　（浙江大学）
马晟利　（黑龙江省人民医院）
杨德琴　（重庆医科大学）
王　智　（中山大学）
侯本祥　朱　眪　（首都医科大学）
杨维青　（广东医学院）
施文元（Oral Biology, School of Dentistry University of California, Los Angeles, USA）
肖　谨　**Hyun Koo**（Center for Oral Biology, University of Rochester Medical Center, Rochester, New York, United States of America）
宋志军（Department of Clinical Microbiology, University Hospital of Copenhagen, Rigshospitalet, Denmark）
吴　红（Department of International Health, Immunology and Microbiology, Panum Institute, University of Copenhagen, Denmark）
JM Ten Cate［Academic Centre for Dentistry Amsterdam(ACTA), University of Amsterdam and Free University Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands］
徐华焜（School of Dentistry, University of Maryland, United States of America）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

主编简介

周学东教授，1987 年毕业于华西医科大学，获医学博士学位。主要从事龋病病因及防治的基础与应用研究，在口腔微生物学、口腔生态学等领域的研究具有较深造诣。先后主持国家"973"前期项目、自然科学基金重点项目、国家"十五"和"十一五"国家科技攻关项目、科技部国际合作项目、卫生部临床学科重点建设项目、四川省重点科技攻关项目等多项课题研究；主编《实用龋病学》、《实用口腔微生物学与技术》、《实用牙体牙髓病治疗学》、《口腔生态学》、《中华口腔科学》和《微生物生物膜与感染》等学术专著。任 *International Journal Of Oral Science*、*Bone Research*《中国口腔医学年鉴》主编。现任四川大学华西口腔医学院教授、博士研究生导师，四川大学华西口腔医学院院长，口腔疾病研究国家重点实验室主任，国务院学科评议组成员，教育部高等学校口腔医学专业教学指导委员会主任委员，中华口腔医学会副会长，中国医师协会副会长，四川省口腔医学会会长，国际牙医师学院中国区主席、国际牙科研究会中国区主席。



获得四川省有突出贡献的中国博士、中国青年科技奖、卫生部有突出贡献的中青年专家、四川省学术技术带头人、四川省杰出创新人才奖、中国医师奖和国家教学名师奖，享受国务院政府特殊津贴。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

主编简介



施文元教授，1992 年毕业于美国威斯康星大学麦迪逊分校，获遗传学博士学位，现任美国加州大学洛杉矶分校牙学院教授、口腔生物系主任；美国加州大学洛杉矶分校分子生物学学院与微生物学系、免疫学与分子遗传学教授。美国 NIH、原核分子和细胞卫生学基金评审组在细菌信号传递方面的专家和永久成员。

主要从事分子微生物学基础研究，对口腔微生物的分子致病的基础机制和技术发展有新的造诣，在分子微生学领域取得多方面创新性成绩。在世界首位发现细菌有趋电性能力（galvanotaxis），并对其分子机制进行了创新性研究，提出不同信号传递系统能相互交叉。

首次对牙菌斑生物膜中不同细菌间的相互作用进行了遗传和分子水平的研究，目前大多用于不同口腔微生物的遗传工具。首次发现变异链球菌（*S. mutans*）的密度调控，抗菌肽生产调控与疾病的关系，把传统口腔微生物学带入了现代微生物学的行列。

作为课题负责人，先后获得多项 NIH 课题基金以及许多与技术转让及发展有关的科研基金，申请专利 20 多个。先后在 *Nature*、*MMBR*、*Nature Chemical Biology*、*PNAS*、*Mol. Microbiol* 等顶级杂志发表文章近 130 篇，主编了《微生物生物膜与感染》等学术专著。是世界著名的口腔微生物学专家。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

序



正常微生物群与机体健康和疾病的关系越来越受到人们广泛的关注，以生态学理论为基础探讨人体疾病的发生和发展机制将成为临床医学研究的热点之一。口腔微生态学（oral microecology）是医学生态学的一个重要分支，也是口腔医学的新兴学科。口腔生态学研究已经深入到口腔医学的各个领域，包括人类常见的口腔感染性疾病、牙修复和种植、口腔正畸治疗、颌面部肿瘤及非肿瘤性疾病、唇腭裂治疗等。研究发现，一些口腔疾病的发生与口腔微生态的平衡失调有着密切的关系。从生态学全新的角度，探讨口腔健康及口腔常见疾病的发病机制和疾病的防治方法，已成为当代口腔医学的一个新亮点。

四川大学华西口腔医学院周学东教授和美国加州洛杉矶分校牙学院的施文元教授，联合国内和国外口腔临床医学、口腔微生物学及口腔生态学研究学者，共同编写《口腔微生态学》专著，该书全面系统介绍了口腔微生态学的基本概念、研究成果和前沿研究方向，是作者们长期从事口腔微生物、口腔微生态等领域研究成果的汇集，实属一本难得的好书。希望读者们能从中受益，并在实际工作中不断创新。

中国工程院院士李兰娟

浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室

2012年12月25日

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

前 言

口腔微生态学是一门介于口腔基础医学和临床医学之间的新兴学科。主要是研究口腔组织器官与口腔微生物群以及口腔微生物群相互之间的关系，探讨口腔健康的维护及防治口腔常见疾病的方法。近年来，有关该领域的研究速度发展很快，成果较多，我们特组织了高等医学院校和牙医学院的第一线科研人员参加编写了国内第一本《口腔微生态学》专著。该书密切结合临床实际，较系统地介绍了口腔微生态系的特性及动力生态学、口腔正常微生物群的相互关系和口腔生态系的生态平衡与生态失调、口腔常见感染性疾病的生态学、口腔疾病的发病机制及生态防治以及口腔微生态学常用的研究方法，特别是重点介绍了现代分子生物学新进展和新技术的应用。所涉及的学科领域有口腔医学、微生物学、微生态学、免疫学、分子生物学、检验医学和临床医学等。因此，本书不仅供科研工作者、临床医生和教师作为参考书用，也可供研究生和医学生作为选修课用。

最后，再次感谢各位作者能挤出宝贵时间为本书撰稿，保证了本书的出版。也感谢著名的微生态学专家李兰娟院士为本书作序。为了进一步提高本书的质量，以供再版时修改，因而诚恳地希望各位读者、专家提出宝贵意见。

周学东　施文元

2013 年 4 月

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

目 录

第一章 医学微生态学基础 …… 1
第一节 正常微生物群与微生态系 …… 1
一、正常微生物群分类与分布 …… 1
二、人体各部位的微生态系 …… 3
第二节 微生态平衡与失调 …… 5
一、微生态平衡的标准 …… 5
二、微生态失调的分类 …… 6
三、微生态失调的诱发因素 …… 7
第三节 微生态学研究的进展 …… 7
一、口腔微生态学研究进展 …… 8
二、肠道微生态学研究进展 …… 11

第二章 口腔微生态学基础 …… 13
第一节 口腔微生态学研究概况 …… 13
一、口腔微生态学定义 …… 14
二、研究的目的与意义 …… 15
第二节 口腔微生态系 …… 15
一、口腔微生态空间的环境因子 …… 15
二、口腔生态空间的特点及微生物组成 …… 16

第三章 口腔微生物群的演替 …… 22
第一节 口腔微生物的来源 …… 23
第二节 口腔微生物的演替 …… 23
一、生理性演替 …… 23
二、病理性演替 …… 25

第四章 口腔正常微生物群 …… 27
第一节 口腔微生物组 …… 27
一、口腔细菌组 …… 28

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、口腔真菌组 …… 31
三、口腔病毒组 …… 32
四、口腔古菌组 …… 33
第二节　核心口腔微生物组 …… 33
一、链球菌属 …… 34
二、普雷沃菌属 …… 36
三、嗜血菌属 …… 36
四、罗斯菌属 …… 37
五、韦荣菌属 …… 38
六、奈瑟菌属 …… 38
七、梭杆菌属 …… 39
八、卟啉单胞菌属 …… 41
九、放线菌属 …… 41
十、棒状杆菌属 …… 42
十一、二氧化碳嗜纤维菌属 …… 43
第三节　口腔微生物种群的生态链 …… 44
一、口腔细菌种群间的生态链 …… 44
二、细菌与真菌种群的生态链 …… 46
三、病毒与细菌种群的生态链 …… 49
第四节　口腔微生物新种 …… 52
一、新菌属 …… 53
二、新菌种 …… 54

第五章　口腔微生态境中细菌黏附 …… 62
第一节　非特异性黏附 …… 62
一、范德华引力与表面电荷 …… 62
二、钙桥作用 …… 63
三、氢键作用 …… 63
四、疏水作用 …… 64
第二节　特异性黏附 …… 64
一、黏附素-受体学说 …… 64
二、脂磷壁酸-葡聚糖-葡糖基转移酶复合体作用 …… 68
第三节　黏附过程与影响因素 …… 71
一、细菌初始黏附 …… 71
二、细菌共黏附 …… 72
三、口腔生物膜形成过程 …… 73
四、与黏附相关的宿主因子(受体) …… 74
五、与黏附相关的微生物因子(黏附素) …… 78
六、黏附介质的作用 …… 85

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第六章　口腔生态系动力学 …… 90
第一节　生态系的动力学基础 …… 90
一、能量流 …… 90
二、物质流 …… 92
三、信息流 …… 94
第二节　群落行为生态学 …… 97
一、群落稳定性和多样性 …… 97
二、群落对紊乱的反应 …… 103
第三节　群落遗传生态学 …… 107
一、基因多样性 …… 107
二、物种形成 …… 107
第四节　口腔生态系的平衡与失调 …… 108
一、基本概念 …… 108
二、口腔生态平衡和失调 …… 109
第五节　动力学影响因子 …… 114
一、唾液和龈沟液 …… 114
二、牙脱矿和再矿化 …… 114
三、微生物的相互作用 …… 115
四、宿主行为及个体差异 …… 118

第七章　口腔微生物组群的生态关系 …… 121
第一节　影响口腔微生物组群生态关系的主要因素 …… 121
一、营养底物 …… 122
二、代谢产物 …… 122
三、细菌素 …… 124
第二节　共生与拮抗对口腔微生物群落的影响 …… 125
一、细菌间相互作用与生物膜内细菌定植 …… 126
二、密度感应系统相关信号分子与生物膜形成 …… 126
三、细菌间相互作用与生物膜致病性 …… 127
第三节　细菌生物膜内遗传物质交换 …… 128
一、生物膜中通过转化进行的基因转移 …… 129
二、生物膜中通过接合进行的基因转移 …… 131
三、噬菌体与生物膜及基因转移 …… 131

第八章　牙菌斑生物膜微生态境 …… 135
第一节　唾液获得性膜 …… 135
一、获得性膜的形成 …… 135
二、获得性膜的组成 …… 136
三、影响获得性膜成分的主要因素 …… 136

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

四、获得性膜的生物学作用 …… 137
第二节　牙菌斑生物膜的形成 …… 137
一、细菌黏附与定植 …… 137
二、牙菌斑生物膜的成熟 …… 138
第三节　牙菌斑生物膜中微生物群落 …… 139
一、口腔微生物群落的早期研究 …… 139
二、微生物群落的相互作用 …… 139
三、微生物群落的致病机制 …… 140
四、细菌素对微生物群落的作用 …… 141
第四节　牙菌斑生物膜的微结构 …… 142
一、口腔天然环境内生物膜微观结构 …… 142
二、多菌种生物膜三维结构 …… 144
三、多菌种生物膜 pH 三维分布 …… 148
四、多菌种生物膜对抗生素的反应 …… 148
第五节　牙菌斑生物膜代谢对口腔生态境的影响 …… 150
一、牙菌斑生物膜的物质代谢 …… 150
二、牙菌斑生物膜矿物质转换 …… 151
三、代谢产物对口腔生态境的影响 …… 152
第六节　牙菌斑生物膜生态平衡的调节 …… 154
一、牙齿微环境 …… 154
二、唾液微环境 …… 154
三、微生物相互作用 …… 155
四、碳水化合物 …… 156
五、氢离子浓度 …… 156
六、氟化物 …… 157
七、精氨酸对牙菌斑生物膜微生态系影响 …… 157

第九章　儿童口腔微生态 …… 164
第一节　儿童口腔的特点 …… 164
一、儿童口腔器官生长发育、生理功能的变化特点 …… 164
二、口腔细菌定植特点 …… 166
第二节　生长发育与口腔微生态的关系 …… 167
一、无牙期的口腔微生态特点 …… 167
二、乳牙萌出期的口腔微生态特点 …… 168
三、乳牙列期的口腔微生态特点 …… 168
四、混合牙列期的口腔微生态特点 …… 169
五、年轻恒牙列期的口腔微生态特点 …… 170
第三节　儿童口腔疾病与口腔微生态的关系 …… 170
一、儿童龋病与口腔微生态 …… 170

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、牙髓及根尖周炎与口腔微生态 …… 172
三、儿童牙周炎与口腔微生态 …… 173
四、儿童常见口腔黏膜病与口腔微生态 …… 175

第十章　龋病微生态 …… 177
第一节　牙齿的微生态区 …… 177
一、光滑面微生态境 …… 177
二、邻面微生态境 …… 177
三、点隙窝沟微生态境 …… 178
四、牙齿根面微生态境 …… 179
第二节　龋病的生态学说 …… 179
一、特异性病因学说 …… 179
二、非特异性病因学说 …… 179
三、生态病因学说 …… 179
第三节　龋病微生态 …… 181
一、不同部位龋病的微生态特点 …… 181
二、不同进展速度龋病的微生态特点 …… 183
三、不同阶段龋病的微生态特点 …… 183
第四节　龋病治疗中的生态学原则 …… 184
一、窝洞预备及消毒 …… 184
二、材料选择 …… 184

第十一章　牙髓根尖周病微生态 …… 187
第一节　牙髓根尖周组织的微生态区 …… 187
一、牙髓微生态区 …… 187
二、根尖周组织微生态区 …… 191
第二节　牙髓根尖周组织细菌感染生态 …… 193
一、牙髓根尖周疾病的细菌感染学说 …… 193
二、细菌对牙髓根尖周组织的感染路径 …… 196
第三节　牙髓根尖周疾病的微生态致病学说 …… 197
一、非特异性致病菌学说 …… 197
二、根管内、根尖区生物膜 …… 199
三、宿主与致病菌间的平衡学说 …… 201
四、微生物的致病机制 …… 202
五、宿主对感染微生物的防御机制 …… 205
第四节　牙髓根尖周疾病的微生态系统 …… 208
一、原发性根管感染的微生态 …… 208
二、继发性根管感染的微生态 …… 210
三、根尖外感染的微生态 …… 211

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第五节　临床治疗对生物膜微生态系的作用 …… 212
一、牙菌斑生物膜对治疗药物的抵抗作用 …… 213
二、药物对细菌生态的作用 …… 213
三、抗药细菌的产生 …… 215

第十二章　牙周病微生态 …… 218
第一节　牙周微生态系的构成 …… 218
一、牙周组织 …… 218
二、龈上菌斑和龈下菌斑生物膜 …… 222
第二节　牙周病的病因学说 …… 225
一、特异菌斑学说及非特异菌斑学说 …… 225
二、内源性感染学说及外源性感染学说 …… 226
第三节　牙周微生物 …… 227
一、牙周微生物复合体 …… 227
二、牙周微生物复合体中的主要牙周可疑致病菌 …… 228
第四节　牙周状态与牙周微生态的关系 …… 237
一、牙龈炎微生态特点 …… 238
二、牙周炎的牙周微生态特点 …… 239
三、舌苔微生态与口臭 …… 243
第五节　全身状况与牙周微生态的关系 …… 243
一、吸烟对牙周微生态的影响 …… 243
二、性激素对牙周微生态的影响 …… 246
三、糖尿病与牙周微生态 …… 247
四、心血管疾病与牙周微生态 …… 249
五、早产、低体重新生儿与牙周微生态 …… 253
第六节　牙周病临床治疗与牙周微生态的关系 …… 254

第十三章　口腔黏膜病与微生态 …… 261
第一节　口腔黏膜微生态系统 …… 261
一、口腔黏膜微生态系统的构成 …… 261
二、口腔黏膜微生态系统的特点 …… 263
三、口腔黏膜微生态系统的影响因素 …… 266
第二节　口腔黏膜病生态病因学说 …… 267
一、口腔菌群失调与口腔黏膜病 …… 267
二、免疫功能异常与口腔黏膜病 …… 268
第三节　口腔黏膜病相关的微生物 …… 270
一、与口腔黏膜病相关的病毒 …… 270
二、与口腔黏膜病相关的假丝酵母菌 …… 277
三、与口腔黏膜病相关的细菌 …… 281

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

四、与口腔黏膜病相关的螺旋体 …… 283

第十四章　口腔颌面部疾病的微生态 …… 286
第一节　颌面部组织及生态学特点 …… 286
第二节　颌面部感染的微生态 …… 287
一、牙源性感染 …… 287
二、非牙源性颌面部感染 …… 289
第三节　唾液腺非肿瘤性疾病的微生态 …… 290
一、唾液组成与功能 …… 290
二、唾液腺非肿瘤性疾病及其微生态特点 …… 291
第四节　唇腭裂患者的口腔微生态 …… 293
一、唇腭裂的解剖特点与治疗 …… 293
二、唇腭裂患儿的口腔微生态特点 …… 293
三、唇腭裂患者手术前后口腔微生态的变化 …… 294
第五节　口腔癌微生态 …… 295
一、口腔细菌与口腔癌 …… 295
二、口腔病毒感染与口腔癌 …… 297

第十五章　口腔正畸及修复的微生态 …… 302
第一节　正畸和修复材料的生态学 …… 302
一、生物材料对口腔微生态的影响 …… 302
二、生物材料对口腔正常微生物的影响 …… 303
第二节　正畸矫治的生态学 …… 303
一、正畸矫治的生态学问题 …… 303
二、各种正畸矫治器对微生态和细菌黏附的影响 …… 304
三、正畸矫治生态学问题的防治 …… 305
第三节　义齿修复的生态学 …… 308
一、活动义齿修复的生态学问题 …… 308
二、全口义齿对口腔微生态的影响 …… 309
三、固定义齿修复的生态学问题 …… 310
四、义齿修复中微生态学问题的防治 …… 311
第四节　种植义齿修复的生态学 …… 313
一、种植体周围微生物及生态学问题 …… 313
二、种植体对微生态的影响 …… 314
三、种植体生态学问题的防治 …… 315
第五节　复合树脂与牙科粘接系统的生态学 …… 316
一、复合树脂与牙科粘接系统生态学问题 …… 316
二、复合树脂与牙科粘接系统对微生态的影响 …… 317
三、复合树脂粘接修复的生态防治 …… 317

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第十六章　口腔感染性疾病的生态防治 …… 321
第一节　口腔疾病生态防治的基本原则 …… 321
第二节　口腔疾病生态防治的主要措施 …… 322
一、龋病的生态防治 …… 322
二、牙周疾病 …… 323
三、口腔黏膜病 …… 324
四、义齿修复及固定矫治中口腔问题的生态防治 …… 325
第三节　全身性疾病口腔并发症的生态防治 …… 326
一、白血病 …… 326
二、糖尿病 …… 327
三、癌症放化疗后 …… 328
四、器官移植术后 …… 329

第十七章　口腔微生态学的研究技术 …… 331
第一节　口腔正常微生物群落分析的传统技术 …… 331
一、微生物生长曲线的测定 …… 331
二、菌落形成单位的测定 …… 332
三、微生物黏附力检测 …… 335
四、PCR 技术分析微生物菌落多样性 …… 335
五、DGGE 技术检测微生物菌落多样性 …… 337
六、原位荧光杂交技术(FISH) …… 338
第二节　口腔微生物宏基因组学研究 …… 339
一、口腔微生物组与宏基因组学 …… 339
二、基因芯片技术 …… 340
三、下一代测序技术 …… 344
四、下一代测序技术检测口腔微生物多样性分析 …… 354
五、口腔微生物宏基因组学研究展望 …… 359
第三节　牙菌斑生物膜形成实验 …… 361
一、龈上菌斑生物膜体外形成实验 …… 362
二、龈上菌斑生物膜体内形成实验 …… 365
三、龈下菌斑生物膜模型 …… 365
第四节　牙菌斑生物膜结构检测 …… 366
一、基本生物量的测定 …… 366
二、结构观察和组成分析 …… 366
第五节　生物膜胞外聚合物的检测 …… 370
一、EPS 破坏性分析 …… 371
二、EPS 非破坏性分析 …… 372
第六节　口腔微生物毒性因子的检测 …… 372
一、细菌侵袭性检测 …… 372

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、细菌内毒素的检测 …… 374
三、侵袭酶活性测定 …… 375
四、其他毒力因子检测 …… 376
第七节　口腔微生物蛋白质组学 …… 377
一、双向凝胶电泳分离蛋白质 …… 378
二、质谱分析鉴定蛋白质 …… 379
三、蛋白质组学在口腔微生物研究中的应用 …… 381
第八节　口腔微生物代谢组学研究 …… 383
一、代谢组学技术平台 …… 383
二、代谢组学方法在微生物领域里的应用 …… 388
三、代谢组学方法在口腔微生物及口腔疾病领域里的应用 …… 391
四、最新研究方向及展望 …… 392

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



第一章 医学微生态学基础

微生态学(microecology)是生态学(ecology)中一门新的分支学科,从1977年德国学者鲁西(Voeker Rusch)博士提出微生态学这一名词至今,该学科发展势头迅猛,已成为一门从细胞水平或分子水平上研究微生物与其宿主、环境相互关系和相互作用的交叉性学科。医学微生态学则是微生态学中重要的分支学科,是研究寄居在人体体表和外界相通腔道黏膜表面的微生物与微生物之间、微生物与人体之间以及微生物和人体与外界环境之间相互依存、相互制约关系的学科,研究对象主要是正常微生物群以及引起机会性感染的条件致病菌。近年来,由于微生态学的理论和实践研究不断取得了新成果,使得抗感染的理念、医疗模式和相关的治疗技术都得了更新和发展。

第一节　正常微生物群与微生态系

一、正常微生物群分类与分布

(一) 概念

正常微生物群(normal microflora)是寄生在人的体表和与外界相通的开放性部位,经过长期进化而形成的微生物群。一般情况下,对机体有益无害。由于其中以细菌为主,且对细菌研究得较多而深入,因此,又通称为正常菌群(normal flora)。

(二) 分类

正常微生物群包括细菌、真菌、病毒等微生物。从微生态学出发,正常微生物群可以分为以下类别:

1. 按生境分

(1) 原籍菌(autochthony):长期寄生于皮肤黏膜,在一定年龄和一定部位相对固定的菌群。是在宿主一定时期的特定解剖部位占位密度最高,免疫原性较低,且在正常情况下对宿主健康有益的细菌,常为专性厌氧菌。一般伴随人的终生,又称常住菌。

(2) 外籍菌(allochthony):暂时寄生在皮肤黏膜上的来源于外环境的非致病菌和潜在致病菌。可存在数小时、数天,最多达数月,又称暂住菌(transient flora)。外籍菌在宿主一定时期的特定解剖部位占位密度较低,而免疫原性较高,常为需氧或兼性厌氧菌。

2. 按关系分

(1) 共生菌(symbiotic flora):与原籍菌有共生关系的细菌。正常微生物群中各种细菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

之间常为共生关系。

（2）寄生菌（parasitism flora）：与宿主有寄生关系的细菌。病原微生物中寄生现象非常普遍，病原体常作为寄生物损害机体而引起疾病。

（三）分布

人体许多组织器官在正常情况下没有微生物，即便有少量微生物侵入血流和组织器官，也可由机体内的免疫系统所清除。不同种属的正常微生物群，在人体各部位的分布也有所差异（图 1-1）。人体各部位常见微生物分布见表 1-1。

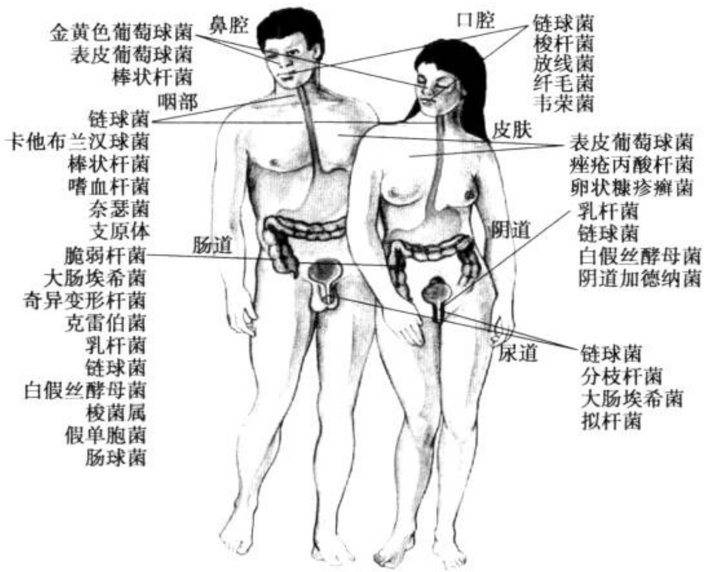


图 1-1　人体正常微生物分布

表 1-1　人体常见微生物分布

部位	主要菌类
皮肤	表皮葡萄球菌、类白喉棒状杆菌、铜绿假单胞菌、丙酸杆菌、白假丝酵母菌、非致病性分枝杆菌等
口腔	葡萄球菌、甲型链球菌、丙型链球菌、肺炎链球菌、非致病性奈瑟菌、卡他布兰汉菌、乳杆菌、类白喉棒状杆菌、放线菌、螺旋体、白假丝酵母菌、梭杆菌等
鼻咽腔	葡萄球菌、甲型和丙型链球菌、肺炎链球菌、非致病性奈瑟菌、卡他布兰汉菌、类杆菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌等
外耳道	葡萄球菌、类白喉棒状杆菌、铜绿假单胞菌、非致病性分枝杆菌等
眼结膜	葡萄球菌、干燥棒状杆菌、非致病性奈瑟菌等
肠道	大肠埃希菌、产气肠杆菌、变形杆菌、铜绿假单胞菌、葡萄球菌、肠球菌、类杆菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、双歧杆菌、真杆菌、乳杆菌、白假丝酵母菌等
尿道	葡萄球菌、类白喉棒状杆菌、非致病性分枝杆菌等
阴道	乳杆菌、大肠埃希菌、阴道棒状杆菌、表皮葡萄球菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

微信公众号

口 腔 视 频

微信搜索qzkqsp1即可关注

福利1

关注后可观看正畸、修复、种植等精彩内容

福利2

关注后领取口腔解剖病理学视频讲座全集

福利3

加入视频分享交流群，解答疑难病例，获取更多视频资源

扫二维码，关注公众号
领取更多口腔资料

正常微生物群在阻止外来致病菌突破皮肤黏膜生理屏障，使机体免受感染；在参与机体的物质代谢、营养物质转化及合成；在促进机体免疫器官的发育和刺激其产生免疫应答；以及在抗衰老作用和抗肿瘤等方面，都有一定的作用。

二、人体各部位的微生态系

微生态系是由正常微生物群与宿主（环境）组成，由宿主常住微生物群与宿主生态区在长期进化过程中形成的。人体不同部位的正常微生物群及其所在宿主局部环境具有各自的特点。了解不同部位微生态系的基本组成、特点及影响因素对感染的诊断和防治具有重要作用。

（一）皮肤微生态系

皮肤常住菌主要有葡萄球菌、丙酸杆菌、类白喉棒状杆菌和铜绿假单胞菌等，其中最重要的是丙酸杆菌和表皮葡萄球菌。暂住菌主要有金黄色葡萄球菌和链球菌等。寄生在皮脂腺内的丙酸杆菌能分解其中的三酰甘油为脂肪酸，对皮肤暂住菌群有一定抑制作用，并对潜在致病菌与暂住菌有溶解作用，但对常住菌无明显抑制作用。因此，该菌对保持皮肤常住菌的稳定和维持微生态平衡有重要作用。皮肤的正常微生物群不仅能防御外来病原菌的入侵，而且有营养作用，还能协助皮肤发挥免疫及自净等生理功能。

目前，采用现代宏基因组学的技术对皮肤微生物群进行研究，已经发现了许多新的微生物群。依据 16S RNA 测序的结果，皮肤表面大多数的微生物归属于拟杆菌门、硬壁菌门、蛋白菌门和放线菌门。

（二）口腔微生态系

人的口腔中已发现有 600 多种细菌，在口腔中定居的微生物与人体组成了口腔微生态系（oral ecosystem）。口腔链球菌是颊、硬腭黏膜最主要的正常菌群，约占培养菌总数的 60%，其中以唾液链球菌为最多见。唾液链球菌和革兰阳性丝状菌是舌背的优势菌。放线菌、马氏棒状杆菌、链球菌及缓症（轻型）链球菌是龈沟的优势菌，约占培养菌总数的 70% 以上，其次为韦荣球菌和其他革兰阴性杆菌。

口腔微生物通过牢固附着在牙面形成牙菌斑（dental plaque），牙菌斑是寄生在牙齿表面的以细菌为主的生物群落。口腔感染性疾病主要是口腔微生态失调的结果。

口腔正常微生物群种类多样，其组成不仅有个体间差异，而且在同一个体或同一部位相邻位点间亦有明显差异，口腔菌群组成的复杂性和多变性是成年期口腔的重要特征。

（三）肠道微生态系

肠道与微生物群组成一个庞大微生态系。肠腔内存在大量微生物，约占人体微生物总量的 80%，其中以细菌为主，占粪便重量的 30% ~ 40%，其中厌氧菌为需氧菌的 100 ~ 1000 倍。

1. 不同部位的特点

（1）小肠：十二指肠、空肠及回肠分别有不同的微生物群。通过小肠内容物定量检测证明从十二指肠到回盲瓣附近细菌数逐渐增多，以回肠末端的微生物最多，该部位 pH 和 Eh 均低，有利于专性厌氧菌生长，因此 95% 以上是厌氧菌。

（2）大肠：主要包括盲肠和结肠，是胃肠道中微生物群最多的部位。盲肠与结肠的生态环境和微生物群都较相似。在正常人体内结肠的主要菌群相对稳定，即机体、细菌及肠内生

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

态环境呈平衡状态。粪便是含有最多微生物群的大生态系，其中的微生物群的种类与数量是一定的、有规律的。因此，研究粪便主要菌群的变化具有诊断意义。

2. 肠道正常微生物群的类型

（1）致病性类型：主要包括韦荣球菌、葡萄球菌、变形杆菌及假单胞菌，菌量少，是正常人体保持微生态平衡的必要组成成员；但在病理情况下，可大量繁殖而感染致病。

（2）互生性类型：主要包括双歧杆菌、类杆菌、真杆菌和消化球菌；数量多，恒定存在；对人体有益无害，为生理性菌群，具有合成维生素、促进蛋白质消化吸收、生物拮抗及免疫刺激等生理作用。

（3）中间性类型：主要包括乳杆菌、大肠埃希菌、链球菌和韦荣球菌，数量介于前两者之间，既有生理作用，也有致病作用，如大量繁殖可导致物质腐败、产生致癌物与毒素，促进人体老化。

（四）生殖系统微生态系

在人类的生殖道黏膜表面，也分布着大量微生物群。不同种属的微生物群在种类、数量、比例和分布方面都相对比较稳定，与宿主和环境保持着微生态平衡。

阴道常住菌主要有乳杆菌、丙酸杆菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、梭杆菌及粪链球菌，暂住菌主要有肠杆菌、丙酸杆菌、消化链球菌及韦荣球菌。健康妇女阴道分泌物可分离出约30种微生物，其中厌氧菌与需氧菌之比为5∶1。乳杆菌检出率高的个体，其白假丝酵母菌、丙酸杆菌及棒状杆菌检出率也高，提示它们之间有互生关系。孕妇的乳杆菌、白假丝酵母菌和丙酸杆菌等分离率都高于一般妇女，提示在分解糖原、保持低 pH 环境中有协同作用。乳杆菌与 B 群链球菌、大肠埃希菌、类杆菌及金黄色葡萄球菌间有拮抗作用，乳杆菌具有产生酸性生存环境、生物屏障及免疫激活作用。

阴道微生物群会随着卵巢功能的变化、月经、妊娠和年龄的改变等，也发生改变。这是阴道的微生物群落为了适应宿主体内环境的变化而发生的微生态演替，有益于宿主的健康。如果有多种微生物的数量比例或分布位置发生了改变，则引起微生态失调，易导致阴道感染性疾病等。

男性生殖系统除了尿道前段的黏膜表面带菌外，其外生殖器官的其他部位和内生殖器官均无菌，但是也容易受到来自体内外的微生物感染。多种微生物可能在生殖器官定植后形成隐性感染，严重者可出现前列腺炎、附睾炎和精囊炎等。

（五）呼吸道微生态系

健康人上呼吸道定植有需氧、微需氧及厌氧菌，多达21个菌属200多个菌种，细菌类型或浓度随季节和环境变化稍有不同，但相对较稳定。鼻腔液中以厌氧菌为最多，其次为葡萄球菌。鼻咽部和扁桃体常可分离到类白喉棒状杆菌和葡萄球菌，肺炎链球菌、溶血性链球菌及流感嗜血杆菌等具有致病潜能的细菌亦较常见，亦可分离出非溶血性链球菌、奈瑟菌和卡他布兰汉菌。鼻窦无菌。气管和支气管在正常情况下仅有少量细菌，且不永久定植。在细小支气管以下部位、肺脏及胸腔无菌存在。呼吸道的正常菌群可刺激机体产生全身或局部特异性抗体，是防御外来微生物入侵的重要生物屏障。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第二节　微生态平衡与失调

微生态平衡(microeubiosis)是指在长期进化过程中形成的正常微生物群与其宿主生态环境在不同发育阶段的生理性组合的动态平衡。这种组合是一种在共同环境因素影响下、正常微生物群与宿主所形成的相互依赖与相互制约的统一状态。微生态系始终处于动态变化之中,不同年龄、不同发育阶段、不同生态环境都有着特定的微生态平衡,在一定阶段存在着相对的平衡与稳定。但当此平衡因宿主(免疫、营养及代谢等)、正常微生物群(种类、数量、位置等)或外界环境(理化和生物)因素变化而被打破时,新的平衡又可形成,周而复始地进行自我调节。因此,生态平衡是动态平衡,了解并维持这种动态平衡对机体的健康不仅有益,而且十分重要。

微生态失调(microdysbiosis)是微生态平衡的反面,是指正常微生物群之间及正常微生物群与其宿主之间的微生态平衡,在外界环境影响下,由生理性组合转变为病理性组合的状态。包括微生物本身的失调、微生物与宿主的失调、微生物与宿主的统一体与外环境的失调。

微生物与其宿主之间的微生态平衡与失调是可逆的,其转化条件是外环境,转化步骤是从“互生”到“抗生”,最后至“偏生”。当微生物与其宿主之间呈互生状态时,宿主表现为健康状态;两者之间呈抗生状态时,宿主则表现为慢性疾病,即正常微生物群内菌群比例失调;两者之间若呈偏生状态,宿主可产生严重的急性病。

一、微生态平衡的标准

微生态平衡的标准包括正常微生物群、宿主与环境三方面,平衡是三者相互综合作用的结果。判断微生态平衡与否必须综合分析在一定外环境中宿主与正常微生物群因素的结构与状态。

(一) 正常微生物

从微生物方面考虑的标准主要有以下三方面:

1. 定位(location)　微生物群生存的生态空间。对正常微生物群的检查,首先要确定检查的位置。如前所述,同一种群在原位是原籍菌,对人体是有益的,在异位就是外籍菌,对人体就可能是有害的。也就是说,原籍菌与外籍菌在生物学性状上是相同的,但在生态学上是不同的。如肠道中的大肠埃希菌侵入到泌尿道、胆道、腹腔及血液中,就会引起化脓性炎症或败血症。

2. 定性(quality)　分离鉴定正常微生物群的种类。在某一生态环境中正常微生物群的种类是相对稳定的,定性检查应包括正常微生物群落中的所有成员,如细菌、真菌、病毒、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体及原虫等。

3. 定量(quantity)　生态环境中正常菌群的总菌数和各菌群的活菌数。优势菌(predominant bacteria)常常是决定微生态平衡的核心,如在肠道,厌氧菌占优势,此优势菌减少或消失,即会导致微生态平衡的破坏,引起疾病。因此,定量检查是微生态学的关键技术,可以说没有定量检查,就不可能有现代化的微生态学。

微生物的定位、定性及定量亦是处于动态平衡状态。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）宿主

正常微生物群随着人体不同发育阶段及其生理功能的改变而有所变化，是微生态平衡的生理波动。如肠道正常微生物群在婴儿、青少年、成人及老年人就存在着有规律的动态变化，即年龄波动；在哺乳、断乳、出牙、换牙以及妊娠和分娩中生理功能改变时，都存在正常微生物群的变化。小儿在出牙时口腔链球菌的种类与数量都有所变化；妊娠7～9个月时口腔厌氧菌明显增加，与雌二酮分泌有关。

（三）环境

在外界环境因素作用下，宿主病理状态对正常微生物群也产生明显影响，如感染、辐射、手术及慢性病等均可导致生态失调。

二、微生态失调的分类

从微生态学的理论和实际出发，微生态失调可分为以下两类：

（一）菌群失调

在微生态环境中正常微生物群的种群发生了定量或定性的异常变化称为菌群失调（flora disequilibrium）。如在使用抗生素后，常在抑制了某一部分细菌的同时，却又促进了另一部分细菌的生长，以至造成正常菌群在数量和组成上的异常变化。故菌群失调亦称比例失调。根据菌群失调的程度将其分为以下三度：

1. 一度失调　可称为潜伏型失调。只能从细菌定量检测发现正常菌群在数量上的变化，临床上常常没有或只有轻微的反应。这种失调多为可逆的，当引起失调的原因除去以后，可自行恢复。

2. 二度失调　可称为局限型失调。菌群内生理波动转变为病理波动，比例失调后，即使诱发原因去除了，仍然保留原来的失调状态，二度失调是不可逆的。临床上多有慢性炎症的表现，如慢性肠炎、慢性肾盂肾炎、慢性口腔炎和慢性咽峡炎等。

3. 三度失调　可称为菌群失调症（dysbacteriosis），即原来的正常菌群大部分被抑制，只有少数菌种占绝对优势的状态。往往是在使用抗菌药物治疗或预防某些微生物感染过程中发生的一种新感染，亦称菌群交替症（microbial selection and substitution）或二重感染（superinfection）。是微生态平衡被破坏的严重后果。临床上表现为急性状态，病情凶险。如葡萄球菌与艰难梭菌引起的假膜性肠炎等。变形杆菌、铜绿假单胞菌、白假丝酵母菌、肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌等，均可引起三度失调。

（二）定位转移

定位转移（translocation）是指正常微生物群寄居部位发生改变而发生的微生态失调，又称异位寄生（abnormal habitation）。根据其转移的特点，定位转移又可分4种：

1. 横向转移　正常菌群由原定位的生态环境向周围转移。如下消化道菌向上消化道的转移，小肠污染综合征就是典型的例证；上呼吸道菌转移到下呼吸道、下泌尿道菌转移到肾盂、阴道菌转移到子宫及输卵管均是常见的正常菌群横向转移。

2. 纵向转移　正常菌群由原定位的表层向深层转移。例如，在正常情况下，口腔黏膜表层是需氧菌，中层是兼性厌氧菌，而下层才是厌氧菌。如果上层的细菌转移向深层，甚至进入黏膜下层，尽管未发生比例失调，也可导致口腔炎等菌群失调性疾病。

3. 血行转移　血行转移本身既是一种异位感染，也可作为异位感染的一种传播途径。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

临床上大约有4% ~10%的健康人有一过性菌血症，而菌血症往往在异位病灶形成之前就已存在。因此，血行途径是正常菌群定位转移的重要途径。菌血症虽然常见，但在正常情况下并不都形成显性感染，只有在免疫功能降低时才发生显性感染。

4. 异位病灶　正常微生物群在远隔的器官或组织所形成的病灶。如脑、肝脏、肾脏、腹腔、盆腔等处的脓肿。异位病灶多与脓毒败血症的发生关系密切。

三、微生态失调的诱发因素

临床上常见诱发微生态失调的因素有物理、化学和生物性因素，都可能引起微生态失调。

（一）抗生素

长期服用广谱抗生素或是使用抗生素的疗程不规范，正常菌群中的敏感菌会被抑制或杀灭，使耐药菌、不敏感的细菌或真菌大量繁殖而导致菌群失调，而且会使那些原来被正常菌群所抑制的内源性或外源性菌得以大量繁殖而造成感染。同时，在抗生素的选择作用下，耐药质粒或耐药基因的转移，使正常微生物群获得对一种或多种抗生素的耐药性。

（二）放射线

机体在接受放射性物质与放射线照射后，吞噬细胞的功能和数量均明显下降，淋巴屏障功能减弱，血清的非特异性杀菌作用降低或消失，免疫应答能力均有不同程度的破坏，此时，常易发生微生态失调。第二次世界大战期间，原子弹在日本广岛、长崎爆炸后引起的放射病，最主要的并发症就是微生态失调及其因此而引起的各种感染。

（三）侵入性的诊疗

手术（包括整形、插管等侵入性诊疗措施）可不同程度地破坏正常的生理解剖结构，有损于正常微生物栖居的生境，有利于正常微生物的异位转移，引起微生态失调。例如，外科手术时可使患者皮肤黏膜的正常菌群经手术切口进入血流、腹腔、胆囊、胸腔、泌尿生殖道等部位，如果大量繁殖则可引起相应的感染性疾病。支气管镜、膀胱镜检查，引流管、血管插管等侵入性的诊疗操作均可将黏膜或皮肤的正常菌群带入相应的组织或器官。

（四）其他因素

医源性因素、免疫抑制剂、激素等药物的使用以及能导致机体免疫功能降低的因素都会引起微生态失调，引起感染。

第三节　微生态学研究的进展

世界卫生组织（WHO）提出医学面临着人类亚健康与难治性疾病两大主题，人们已经意识到要防治亚健康和疑难性疾病，也涉及人体微生态的调节。

随着微生物学、分子生物学、宏基因组学、蛋白组学、代谢组学等理论和技术的发展，也推动了医学微生态学的快速发展。特别是微生物宏基因组学（microbial metagenomics）的兴起，我们就可以对人的某一部位用基因组学的方法，去全面揭示那些过去用单纯生物学方法（如传统的细菌培养和分离）所不能够发现的新微生物，进一步还可以发现这些微生物在人类健康与疾病方面的重要作用。2009年，Costello等对27例正常人在不同时间的皮肤和黏膜标本做了细菌16S核糖体RNA测定后，发现正常菌群与人体免疫功能的调节有较密切的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

联系。目前的研究还发现微生物的感染不仅仅涉及微生物和宿主相互间的作用,外在的环境因素(如饮食)也起着一定的影响作用。

下面主要以口腔微生态学和肠道微生态学为例,介绍近年来所取得的重要进展。

一、口腔微生态学研究进展

口腔微生态学作为微生态学的重要分支学科,在近30年来也得到了很大的发展,并取得了令人瞩目的成绩,包括口腔微生物组研究、牙菌斑生物膜研究、口腔微生物相互关系研究等。

(一)口腔微生物组研究

美国国立卫生研究院(NIH)于2007年12月19日宣布正式启动新的基因工程——人类微生物组项目(Human Microbiome Project,HMP)。HMP的主要目标之一是通过宏基因组学方法和传统基因组DNA测序方法,阐明人体微生物组构成及影响微生物分布和进化的因素,为进一步了解人体相关微生物群落在人类遗传及生理多样性上的作用和意义,揭示人体健康和疾病状态与人体微生物组的关系奠定基础。2008年,NIH牙颅颌面研究所(NIDCR)启动了第一个口腔微生物组综合数据库,称为人类口腔微生物组数据库(Human Oral Microbiome Database,HOMD),并于2008年3月25日正式对公众开放。HOMD由美国波士顿Forthy研究所和伦敦国王学院的科学家联手建立,对口腔细菌的类型、新陈代谢状况、致病能力等进行了详细记录。HOMD相当于一个数字化的口腔微生物牛津词典,提供这些微生物表达的数千种基因详细的生物物种,包括它们的DNA和蛋白质信息以及在科学杂志上的相关论文。HOMD的目标是提供大约600种人类口腔原核生物物种群落的全面信息。该数据库网站的网址为http://www.homd.org。

近年来,通过运用高能测序技术等现代分子生物学技术对健康人口腔微生物组的研究取得了很大的进展,就其种类而言就远远超出已往人们所熟知的人体正常微生物的组成状况。相关研究发现:仅健康口腔的细菌种群就包括了1门古菌、12门细菌,共179个属645种原核生物。核心微生物组的主要类群至少包括5大菌门:厚壁菌门(Firmicutes),包括链球菌属(*Streptococcus*)、韦荣菌科(*Veillonellaceae*)和颗粒链菌属(*Granulicatella*);变形菌门(Proteobacteria),包括奈瑟菌属(*Neisseria*)和嗜血菌属(*Haemophilus*);放线菌门(Actinobacteria),包括棒杆菌属(*Corynebacterium*)、罗斯菌属(*Rothia*)和放线菌属(*Actinomyces*);拟杆菌门(Bacteroidetes),包括普雷沃菌属(*Prevotella*)、二氧化碳纤维菌属(*Capnocytophaga*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*);梭杆菌门(Fusobacteria),包括梭杆菌属(*Fusobacterium*)。

(二)牙菌斑生物膜研究

牙菌斑是口腔微生物在口腔组织表面形成的一种典型的生物膜,也是口腔常见感染性疾病如龋病、牙髓根尖周感染、牙周病和颌面部牙源性感染的致病因子。菌斑生物膜的研究主要包括:生物膜的形成、结构和组成;生物膜内微生物的营养代谢活动、相互关系;生物膜的耐药机制及控制措施等多方面。

扫描电镜、荧光染色和激光共聚焦(CLSM)联合检测技术被用于有关致龋菌和牙周致病菌的单菌种和多种生物膜形成、结构、组成的研究,包括变异链球菌(*Streptococcus mutans*)、黏性放线菌(*Actinomyces viscosus*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophillus*)以及牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、伴放线菌聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、具

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)等单菌种和多菌种生物膜结构及成分的分析报告。在CLSM 绿色激光(504~511nm)下观察生物膜的扫描图片,可见变异链球菌微菌落和完整的菌斑生物膜结构,暗色背景下有绿色荧光聚焦的团块,呈团块条索状结构分布(绿色)的是生物膜中的微菌落影像。生物膜的结构呈三维蘑菇状,其间布满水道、孔隙,生物膜 Z 轴的断层扫描可见致密的微菌落。在经 Calcofluor 染色的生物膜中,细菌细胞和胞外多糖包裹成团块状,变异链球菌细胞呈红色,胞外多糖呈蓝色荧光,为不均匀的片状分布。

密度感应信号系统在牙菌斑生物膜的形成和致病中的作用是目前口腔微生物生态学研究的重要课题之一。以生物膜细菌密度为依赖的信号转导系统又称密度感应系统。在大多数革兰阳性菌和革兰阴性菌中都发现了自诱导分子-2(autoinducer-2,AI-2)系统的存在。AI-2 是菌种间交流的信号分子。AI-2 信号分子可与不同种的细菌双组分激酶识别系统识别介导信号交流。在牙菌斑细菌如变异链球菌、格氏链球菌、放线菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普雷沃菌都发现 AI-2 的存在。牙菌斑中很多革兰阳性细菌(如变异链球菌、缓症链球菌、仓鼠链球菌等)都检出了信号感受肽(competence stimulating signal peptide,CSP),而正常生物膜的形成以及致龋基因的表达有赖于一定量浓度的 CSP 存在。研究发现变异链球菌中的 CSP 介导的密度感应调节系统与变异链球菌的单一菌种生物膜形成有密切关系。美国 NIH Kolenbrander 教授研究了口腔早期定植菌:链球菌和放线菌,小韦荣菌 PK1910 菌株与伴放线菌聚集杆菌 JP2、具核梭杆菌 ATCC10953 的集聚和生物膜形成的影响因素,指出牙菌斑是人口腔细菌生活在一个多菌种社会的生物膜。

研究发现,生物膜细菌的耐药力明显强于游离细菌,对生物膜细菌的抑制或杀灭也明显难于游离细菌。此外,耐药质粒的传递在生物膜状态下也明显优于其游离状态。相关的研究还待深入。

了解菌斑生物膜内微生物的营养代谢活动,特别是微生物之间的相互关系是建立控制生物膜措施的首要条件,相关内容将在下面叙述。

(三)口腔微生物相互关系的研究

口腔微生物的相互关系与口腔的健康和疾病密切相关,所以微生物之间的相互关系研究是口腔微生态学研究的重要课题之一。已有的研究大多为在游离状态的 2~3 种细菌的相互关系,目前的研究是了解在生物膜状态下细菌之间的相互关系,包括相互集聚关系、相互营养关系、相互通信关系和相互拮抗关系等,这是一项最为复杂、最有难度的研究课题。

1. 共聚关系　口腔细菌之间的共聚关系在其黏附定植中的重要作用已被证实。在菌斑生物膜中,细菌通过共聚桥形成典型的麦穗状和瓶刷状结构。Takemoto 等发现具核梭杆菌 ATCC10953 作为共聚桥,能与除表兄链球菌(*Streptococcus sobrinus*)外的大多数链球菌产生共聚,对牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythensis*)和螺旋体也有很高的共聚力,而该特性有助于这些细菌在龈沟的牙根面的黏附和定植。在高氧浓度条件下,具核梭杆菌细胞可拉长变大,形成交织的网状结构,将牙龈卟啉单胞菌包裹于其中。研究发现具核梭杆菌 PK1594 菌株的相对分子质量为 3×10^4 的外膜多肽可介导其与牙龈卟啉单胞菌 PK1924 和伴放线菌聚集杆菌(*A. actinomycetemcomitans*)JP2 菌株的共聚。

2. 营养关系　研究发现菌斑生物膜细菌之间存在复杂的相互营养关系和代谢交流(metabolic communication)。奈瑟菌产生口腔链球菌和乳杆菌需要的支链淀粉和果聚糖。变异链球菌和唾液链球菌可合成其他口腔细菌作为能源的葡聚糖(Glucosan);沃廉菌属

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

(*Wolinella*)可利用放线菌等细菌产生的甲酸盐(formate),而且还产生产黑色素类革兰阴性厌氧杆菌生长必需的特殊营养物质——血红蛋白(protoheme)。产黑色素类革兰阴性厌氧杆菌产生栖牙密螺旋体所需的丁酸,而后者则提供前者生长所需的琥珀酸。韦荣菌利用变异链球菌等乳酸菌产生的乳酸并分解成优杆菌等细菌要求的醋酸。具核梭杆菌产生的N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic acid)有助于牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌和螺旋体等口腔细菌在龈沟和牙根面的定植和生长。研究者们希望通过阻断这种相互的营养关系以达到控制菌斑生物膜的目的。

3. 通信关系 细菌之间存在的通信关系又称信息流(information flow)。密度感应信号系统是目前致龋菌和牙周致病菌研究的热门课题之一。在口腔的大多数革兰阳性菌和革兰阴性菌,如变异链球菌、戈氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)、放线菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普雷沃菌(*Prevotella intermida*)均发现了可与不同种细菌双组分激酶识别系统识别介导信号交流的AI-2信号分子。研究者在变异链球菌和缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)等菌种中检出了信号感受肽CSP。变异链球菌的CSP介导的密度感应调节系统与其单一菌种生物膜形成有密切关系。

4. 竞争与拮抗关系 微生物之间的相互竞争和拮抗关系不仅是微生物世界一种基于生存要求的自然现象,也是微生物世界维持生态平衡的基础。微生物之间的相互竞争和拮抗关系表现为定植生境、营养源、生长因子的争夺,而与拮抗相关的则是微生物自身产生的一些抑制因子,如细菌素和毒性产物(H_2O_2、有机酸、吲哚)等。血链球菌和口腔链球菌产生的H_2O_2对如牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌、具核梭杆菌以及二氧化碳噬纤维菌(*Capnocytophaga*)等革兰阴性的无芽胞厌氧杆菌有抑制作用;变链球菌产生的变链素(Mutacin)不仅可抑制血链球菌和口腔链球菌,而且对变链球菌自身也有一定的抑制作用。目前已发现变异链球菌至少有5种类型的变链素:变链素Ⅰ~Ⅴ。变链素Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ属于含羊毛硫氨酸的乳链菌肽,抗菌谱相对较宽;变链素Ⅳ、Ⅴ则是未修饰的非乳链菌肽,其抗菌谱相对较窄。

(四)方法学探讨

近期采用基因多态性检测方法研究口腔微生物组的结果显示与采用传统培养技术为基础的相关研究之间存在着严重偏差。Staley 和 Konopka 认为仅有低于1%的微生物可以在实验室环境下生长,所以必须采用以DNA为基础的现代生物学技术和方法,如16S rRNA基因测序技术、高通量指纹技术、宏基因组学技术以及下一代测序技术,使人类可以在结构复杂性和基因多态性的意义下更清晰地研究和了解人体微生物组。

2005年,美国国立卫生研究院人类微生物组项目采用16S rRNA序列分析技术和样本DNA的16S rRNA分析对5个年龄在23~55岁健康人的口腔正常细菌进行分析,结果发现2589个菌落中,有141个优势菌种被检出,60%以上的菌种不能被培养,13种新的生物型被鉴定。在所有部位都可检出的菌属是:孪生球菌属(*Gemella*)、颗粒链球菌属(*Granulicatella*)、链球菌属和韦荣菌属,这一结果与已有的研究结果差异很大。一些菌种存在于特殊的个体并在大部分部位检出,而其他一些菌种则存在于特殊的部位。在大部分部位含有20~30种不同的优势种群。在9个检测部位,优势菌种的检出率为34~72种/部位,包括颊纤毛菌、浅黄色奈瑟菌、副流感嗜血菌、简明弯曲菌、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、普雷沃菌属(*Prevotella*)、麻疹孪生球菌(*Gemella morbilli*)、溶血孪生球菌(*Gemella haemolysans*)、唾液链球菌、具核梭杆菌多形亚种。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

2010 年，Kanasi 等对 80 个患龋和无龋婴幼儿牙菌斑微生物的 16S rRNA 序列克隆分析发现，患龋和无龋婴幼儿牙菌斑存在 139 种不同微生物。

2008 年，Keijser 等用焦磷酸测序技术（pyrosequencing technology）发现，在 98 个健康成人口腔牙菌斑中包括了 10 000 种（3% OTUs 差别）微生物表型，其菌种数远远超过已报道的通过培养或者传统克隆和测序技术定义的 700 种口腔微生物表型。

2009 年，Zaura 等学者利用 454 焦磷酸测序技术检测了 3 名正常高加索人口腔内 5 个部位的微生物组，结果发现在正常人口腔中有 3600 种独特序列，超过 500 种不同的分类单元或“物种级”表型，和 88 ~ 104 种高级分类群（属或更具包容性的类群）。每个单独的样品平均藏匿有 266 种“物种级”表型，颊部样本多样性最小，牙齿邻面样本多样性最高。主成分分析结果显示来源于牙面的样本占据了所有部位的主要构成。从 3 个个体微生物组测序结果分析可知，高级分类群、“物种级”表型和独特序列都有一个较大的重叠。84% 的高级分类群、75% 的 OTU（分类单元）和 65% 的独特序列至少在 3 个微生物组中的 2 个存在。这 3 个个体的总共 6315 个独特序列中有 1660 个相同序列，这 1660 个相同序列即“核心微生物组”贡献了 66% 的测序内容，重叠的 OTU 贡献了 94% 的内容，而几乎所有的内容（99.8%）都属于共享的高级分类群。研究提示存在健康口腔核心微生物组的概念，其优势细菌是链球菌属、韦荣菌科、颗粒链球菌属、奈瑟菌属、嗜血菌属、棒状杆菌属、罗斯菌属、放线菌属、普雷沃菌属、二氧化碳噬纤维菌属、卟啉单胞菌属以及梭杆菌属。

二、肠道微生态学研究进展

从 2005 年以来，《Science》、《Nature》等杂志陆续报道肠道正常微生物为人体提供了营养、调控肠道上皮细胞发育并诱导先天性免疫，其功能类似于人体内的一个“器官”，破坏肠道微生物就是损害了人体健康。2007 年后，浙江大学医学院先后承担了“肠道微生态与感染的基础研究”和“肠道细菌微生态与感染及代谢的研究”的“973”项目。李兰娟院士等在有关肠道微生物群落及功能、肠道微生物与炎症性肠病以及在肝病感染、微生态调节等方面都取得了重大成果。2010 年 3 月，《Nature》发表了欧盟资助的“人类肠道宏基因组计划组”对人肠道菌群的宏基因组研究结果，通过分析 124 名欧洲人的肠道菌群，发现有 330 万个人体肠道宏基因组参考基因，平均每个人体内含有 1000 ~ 1150 种细菌，有 160 种优势菌种。肠道系统中细菌的基因组又是控制人体健康的“人类第二基因组”，这将为肠道疾病的预防和相关药物的开发奠定良好基础，引起了学者们的极大兴趣。

近年来，肠道微生物群落与宿主相互作用的研究也取得进展，发现了诸如肠道菌群与宿主的消化、营养、代谢、免疫、感染等方面的关系十分密切。美国 JI. Gordon 的研究表明，肠道菌群的作用不仅能帮助宿主从食物中获取更多能量，更重要的是能调节宿主的脂肪存储组织细胞的基因表达活性，使宿主增加脂肪的积累，与肥胖等代谢性疾病的发生有重要关系。通过对 5088 个来自于相同饮食结构的遗传性肥胖小鼠（ob/ob）和瘦型小鼠（ob/+，+/+）肠道末端微生物的 16S rRNA 基因序列分析，发现肥胖小鼠肠道中拟杆菌门细菌的丰度下降了 50%，而厚壁菌门细菌的比例升高。经过对人体试验的研究，其结果与上述动物试验的结果相同，12 名肥胖患者在坚持采用碳水化合物的低热量食谱 1 年后，体重明显下降，肠道中的拟杆菌门微生物的丰度升高，而厚壁菌门微生物的比例下降。

类似的研究报道很多，进展也快。采用微生物宏基因组学和微生物分子生态学的技术，

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

已在肠道微生态与人体健康关系方面的研究得到了广泛的应用。

微生物分子生态学是以微生物的 DNA 序列多样性来反映微生物物种的多样性，这就克服了采用培养方法来研究的局限性，可以更加客观和全面地分析肠道菌群的组成及结构，也能对同一个体的肠道菌群结构随着疾病的发生发展所产生的动态变化进行研究。现在，采用高通量、大规模新一代测序技术（如 454 焦磷酸测序等），可以对肠道微生物宏基因组测序，直接得到肠道微生物群落的组成及相关功能信息。我国学者赵立平教授领导的实验小组采用小鼠为模型，评价了宿主基因和饮食在改变肠道菌群组成和调控代谢综合征相关表型的变化。他们在种的水平上，共鉴定出有 65 个细菌类群与饮食结构的差异、宿主基因型差异和宿主的健康状况有关。不论宿主的基因型如何，若摄入高脂肪饲料后，都会使具有保护肠道屏障功能的双歧杆菌属细菌的丰度下降。研究结果表明饮食结构对于决定肠道菌群结构具有重要作用，不合理饮食会引起肠道特定细菌类群的改变，即便是动物具有正常的基因组，也会因肠道菌群失调而发展为代谢综合征。这一研究思路为我们在人类研究肠道微生态与慢性代谢性疾病的关系以及采用以肠道菌群作为靶点的饮食干预等提供了借鉴。

（贾文祥　肖晓蓉　宋志军　吴红）

参考文献

1. 康白. 微生态学原理. 大连：大连出版社，2002
2. 贾文祥. 医学微生物学. 北京：人民卫生出版社，2010
3. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science, 2009, 326: 1694-1697
4. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature, 2010, 464: 59-85
5. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature, 2012, 490: 55-60

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第二章

口腔微生态学基础

第一节　口腔微生态学研究概况

口腔微生态学(oral microecology)是微生态学的一个重要分支,为一门介于基础医学与临床医学之间的新兴的边缘性学科,历史较短,但发展迅速。

长期以来,一些口腔常见病,如龋病、牙周病及黏膜病等没有良好的预防措施,其发病率在逐年上升。另外,在修复或正畸治疗后带来的菌群失调等后续问题越来越严重,已引起临床医生的注意和重视。随着人们对疾病本质有了更深刻的理解,发现一些口腔疾病是由于多种因素导致口腔微生态失调的结果,有些"致病菌"来自原籍菌。如何防病、如何保护微生态平衡、如何在高科技治疗手段实施的同时又不造成微生态失调等一系列问题给当代口腔疾病学提出新的课题。

1977 年,德国学者 Voeker Rusch 博士首先提出微生态学这个概念,并在德国 Herborn 建立了第一个微生态学研究所。该所的主要研究工作是关于应用生理性活菌制剂进行生态防治。口腔微生物是人们最早发现的微生物。原生动物学及细菌学的创始人,荷兰的 Antony Van Leeuwenhoek(1632—1723)在 1676 年首先用自制的显微镜观察到牙面标本中的各种球形、杆形和螺旋形的微小生物,后来将其命名为球菌、杆菌和螺旋体,并沿用至今,Leeuwenhoek 也因此被誉为口腔细菌学的鼻祖、细菌学之父。19 世纪 80 年代以后,美国化学家兼牙科医师 Willoughby Dayton Miller 在对口腔微生物的研究中提出了龋病发生的细菌作用机制,即细菌发酵糖产生酸,使釉质脱矿致龋。1890 年,Miller 出版了第一本描述口腔微生物的专著,并提出了牙周病是由非特异性的口腔正常菌群所致的新观点。Miller 被誉为口腔微生物学之父,为了表彰他在口腔微生物研究方面的业绩,在口腔中发现的一个链球菌新种被命名为米勒链球菌(*Streptococcus milleri*)。直到 20 世纪 60 年代初,人们对口腔微生物的认识始终停留在龋病由乳杆菌引起、鹅口疮由白假丝酵母菌引起的研究水平上。1964 年,Keye 对牙周炎动物模型进行深入研究,报道了牙周炎过程中口腔细菌变化,他们的研究对口腔微生态学的发展奠定了一定基础。从 60 年代中期开始,在龋病的研究上出现了一个新的高潮,人们对变异链球菌进行了较为深入的研究,包括该菌的分离、培养、鉴定、流行病学、血清学和致病性的研究。20 世纪 70 ~ 80 年代,对牙菌斑生物膜的研究证明,口腔细菌是龋病、牙周病发生发展的始动因子。同时,大量的文献和专著相继问世,如 Oral Microbiology、Clinical and Oral Microbiology、Oral Biology 等,推动了口腔医学和口腔微生物学的发展。90 年代,国内外专家学者对龋病、牙周病病因的深入探讨,形成了"特异性菌斑学说"和"非特

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

异性菌斑学说”两大学派。随着科学技术的不断进步，厌氧培养技术的飞速发展，人们逐渐发现，原来所谓的“特异性”细菌在健康人的口腔中也可培养出来，只不过存在量的差异，“失调”的概念日趋形成。事实证明，当口腔微生态失调时，即可出现细菌构成比例发生变化，某些菌的含量升高，某些菌的含量减低，这种状况持续一定时间，由量变到质变，这就是疾病的形成过程。无论是口腔、肠道、阴道等机体任何携带细菌的生境，只要长期持续的生态失调都会引发疾病的产生，这一理论也很好地解释了特异性及非特异性菌斑学说。

我国微生态学的研究源于20世纪50年代，由魏曦教授等提出抗生素应用可能引起的菌群失调。作为我国微生态学奠基人，魏曦教授及康白教授于1988年组建了中华预防医学会微生态学分会，康白教授任主任委员。并在1989年创刊《中国微生态学杂志》。从此，我国的微生态学发展迅速。熊德鑫教授及杨景云教授带领研究生活跃在微生态研究领域，发表多篇关于厌氧菌的培养及肠道微生态学论文。康白教授主编《微生态学原理》出版推动了微生态学领域的扩展，促进各专业微生态学分支的产生。围绕微生态学领域，我国微生态学学科带头人李兰娟教授出版了《感染微生态学》，深入细致地阐述了感染微生态学理论，提出感染微生态防治新策略。

多年以来，口腔微生态学领域的学者也在不断并积极探索口腔微生态，相继有周学东教授《口腔生态学》、肖晓蓉教授《口腔微生物学与实用技术》、马晟利《医学口腔微生态学》等著作相继问世。各种核心期刊中经常会刊登有关口腔微生态方面研究的论著。在一些大学中也开设了口腔微生态学相关课程，这一切证明口腔微生态学正孕育着生机和发展趋势。随着生物化学、遗传学、免疫学、分子生物学及悉生生物学的不断发展以及电子显微镜、气（液）相色谱、放射免疫、基因工程、分子探针等新技术日益广泛的应用，口腔微生态学将由起步走向飞跃。

口腔微生态学是一门刚刚兴起的学科，它建立在大量口腔微生物的研究基础上，继肠道微生态学发展后，目前正处于逐步探索、逐步发展、逐步完善的阶段。一些过去无法解释的疾病用微生态学理论可得到解释，对某些疾病的预防和治疗建立了理论根据，尤其为医学上的某些误区及疑惑揭开了谜底。近年来，国内有关口腔微生态方面的研究大量涌现，甚至进一步探讨正常菌群的生物膜、细菌素、基因学等，不仅为口腔疾病的病因学研究和口腔临床的有效防治手段提供了丰富的实验数据，也极大地推动了口腔微生态学的向前发展。

口腔微生态学与其他学科一样属于微生态学的一个分支，重点研究微生态学基本理论、基本知识和技能的为普通微生态学；按宿主不同可分为植物微生态学、动物微生态学、人体微生态学；按研究领域和应用目的可分为农业微生态学、工业微生态学、兽医微生态学、医学微生态学。随着医学微生态学的发展，进一步建立口腔微生态学及肠道微生态学，各分支学科间的相互配合、相互促进，使整个微生态学全面地向纵深发展。

一、口腔微生态学定义

口腔微生态学是研究人体正常口腔微生物群的生物学性状、功能以及与机体相互关系的科学。机体有四大贮菌库，即肠道、口腔、阴道、皮肤。作为四大贮菌库之一的口腔所带细菌就为20g，其中厌氧菌占90%以上，牙菌斑中的菌量更多，每克湿重所含细菌数超过10^{11}。据报道，目前为止，人类口腔细菌多达600种以上，口腔细菌的种类和数量如此之多，在各种口腔疾病的发生发展中起到举足轻重的作用。据统计，微生物的酶大约有35%可为宿主利

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

用，这些细菌与人体及疾病存在有极为密切的关系。

二、研究的目的与意义

口腔微生态学目的是研究口腔组织器官与口腔微生物群以及口腔微生物群相互之间的关系，并阐明口腔组织器官与微生物之间相互作用的生态平衡与生态失调的机制，指导临床维护口腔微生态平衡，防止微生态失调，为口腔疾病现有的治疗材料及手段提供更合理、更完善的科学依据。

口腔微生态学是一门与牙周病学、牙体牙髓病学、口腔黏膜病学、口腔材料学、口腔颌面外科学、口腔修复学、口腔正畸学、儿童口腔病学、口腔预防医学等学科关系极为密切的医学课程，它着重研究口腔内的正常微生物群与人体的生理、病理关系，并以微生态学理论指导及完善临床实践。

微生态学（microecology）研究正常微生物群与其宿主关系的生命科学。微生物学（microbiology）则重点研究微生物的类型、分布、形态结构、代谢、生长繁殖、遗传、进化及其与人类、动物、植物等自然界相互关系的一门生命科学。医学微生态学（medical microecology）是研究正常微生物群与人体关系的生命科学。它侧重于生态学的研究及微生物对宿主的正常生理作用以及生态平衡、生态失调、生态防治方面的研究。医学微生物学（medical microbiology）是研究病原微生物与人体关系的一门科学，重点研究与医学有关的病原微生物的生物学特性、致病性和免疫性，微生物学检查法、特异性预防和治疗原则等的科学。微生物学是生物学，微生态学是生态学，微生物学是微生态学的基础。要学好这门课程，掌握一定的微生物学知识是必要的。

第二节　口腔微生态系

人口腔是一个完整而复杂的生态系，它不仅有适宜各种微生物定植的温度、酸碱度，还有微生物生长所需要的湿度及营养源，如宿主的唾液和龈液或分泌物及食物残渣存留物等，加之口腔解剖的复杂及物理、化学、生物等因素，均给口腔内各种类型的微生物的生长繁殖和定居提供了非常适宜的环境和条件。各种微生物在口腔不同部位共栖、竞争和拮抗，在种群及数量甚或功能上保持一个动态平衡的自稳状态，构成了人类最复杂的口腔微生态系。它的平衡与否与宿主口腔的健康和疾病有着极为密切的关系。

口腔微生态系由口腔微生态环境及口腔微生态空间两部分构成。

一、口腔微生态空间的环境因子

人口腔是消化道的入口，由于生理功能及解剖结构的复杂，形成了特殊的微生态环境，而这一环境与环境中的微生物之间关系密切且相互影响，处于一种动态的适应状态，两者共同主宰着口腔健康与口腔疾病的发生、发展与转归。生态空间的环境因子是影响生态空间中生物生长发育、繁殖和群落分布的环境因素，又称生态因子（ecological factor）。

（一）温度

口腔温度恒定地维持在37℃左右，是细菌生长繁殖的理想温度，这一密闭而恒温的空间成为细菌种类繁多、密度很大的重要因素。多数细菌可在-5℃～55℃环境中生存。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）氧化还原电位

氧化还原电位（oxidation reduction potentials，Eh）指两个电极之间的电位差。由于口腔各部位的解剖结构各异，其氧化还原电位与氧张力各不相同。这种反应为电子从还原剂转移到氧化剂的过程。各种物质均有其氧化还原电位，任何氧化-还原物质连在一起都可以产生氧化还原电位。一个体系中 Eh 值的大小取决于氧化物与还原物的比例。低氧化还原电位是厌氧菌生活的重要条件之一。局部的氧气密度常反映局部氧化还原电位情况。氧化还原电位以微特计测量，阳性电位常表示氧化环境，阴性电位表示还原环境，正常刺激唾液的 Eh 比较高，大约为+309mV 左右，因而有益于需氧或兼性厌氧的微生物的定植。

（三）氢离子浓度

氢离子浓度反映局部的 pH 值，口腔中的 pH 值以唾液 pH 值为代表，正常新鲜的混合唾液，pH 值范围一般在 5.6～7.6 之间浮动，多数时间保持在 pH 7 左右。大多数细菌生长良好，因此，口腔适于多种细菌生存。影响唾液 pH 的因素包括食糖量的多少、唾液的流率甚或机体系统性疾病及菌群失调等。低于 pH 7 的唾液环境适宜耐酸菌的生长，如乳杆菌、酵母菌。

（四）表面化学

口腔中有软、硬两类组织。软组织又有舌、颊、腭等多种表面形态。硬组织以牙为单位，牙齿邻面、龈缘区、颌面沟窝等各种微环境的条件不尽相同，氧气密度各异。细菌的黏附、定植及生物化学变化等因素也影响微生物种类和数量。如牙菌斑的形成过程及龋病过程都包含了一定的化学过程，该方面涉及的领域可能更广泛和深入。

（五）食物营养物质

宿主进食种类对微生物提供各种丰实的营养，可对微生物组成产生重大影响。如增加碳水化合物摄入时，变异链球菌数量随之增多，形成大量胞外多糖，使其易于在牙面附着。

（六）唾液营养物质

包括有机物和无机物，有机物包括蛋白质、尿素、氨基酸、糖类、维生素；无机盐包括钠、钾、钙、氯、磷、氟等。唾液中的营养物质可提供固有菌丛或口腔原籍菌利用。唾液中还含有溶菌酶、补体或抗体等物质，也有抵御外籍菌或维持菌群平衡的功能。

二、口腔生态空间的特点及微生物组成

人口腔生态区由于解剖结构和理化性质的差异可划分为 4 个微生态区：软唾液、软组织黏膜表面、硬组织牙齿、义齿或其他口内矫治装置。这些生态区又包括不同的生境以及生态点和生态位。

（一）软组织黏膜表面

口腔软组织黏膜包括唇、颊、舌、腭和牙龈。这些口腔黏膜表面具有持续上皮组织脱落再生的特性。由于上皮组织的持续脱落，新的上皮表面不断出现，所以在这些黏膜表面定植的微生物，将不断经历吸附-再吸附的定植过程。加之唾液的密切接触，这些黏膜表面的 Eh 比较高。需氧和兼性厌氧的微生物是软组织黏膜表面的优势菌群。正常情况下，构成了抵御外来菌侵袭的菌群屏障，这一屏障对于口腔黏膜具有保护作用。

1. 唇

（1）特性：由鳞状上皮组成的唇黏膜，主要分为唇红缘和唇黏膜的口内部分。角化上皮

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的唇红缘与颌面部皮肤接触，是口腔与外界相通的门户，外界环境和皮肤表面的菌群常在此定植。当纹唇、漂唇时可造成局部菌群改变，该部位也可受到Ⅰ型疱疹病毒的侵害。唇黏膜的口内部分无角化层，与唇侧牙面和唾液接触密切。

（2）菌群组成：唇红缘的主要菌群包括皮肤表面的微球菌和表皮葡萄球菌，唇黏膜口内部分的正常菌群包括唾液和牙光滑面的部分菌群成员，最常见的是口腔链球菌。角化唇炎(cheilitis)的临床标本常常包含白假丝酵母菌和β-溶血链球菌。

2. 颊

（1）特性：颊黏膜是口腔中面积最大的软组织，表面平滑，少有皱褶，为需氧环境，适于需氧菌生存，与唾液的接触最密切，受食物摩擦影响也很大。颊黏膜上皮更新周期为5～16天，陈旧上皮脱落后子代细菌又能在口腔中重新定植。

（2）菌群组成：口腔链球菌是颊黏膜最常见的正常菌群成分。约占该部位可培养菌总数60%的缓症链球菌又是口腔链球菌的主要菌种，其次是唾液链球菌和血链球菌。革兰阳性的丝状菌和其他细菌的检出率都很低。唾液菌群的某些成员如嗜血菌属、奈瑟球菌，可能在颊黏膜短暂停留。

3. 腭

（1）特性：腭黏膜包括软腭和硬腭两个生境。由角化层组成的硬腭，位于口腔前部分，与食物咀嚼摩擦的关系密切，被称为咀嚼性黏膜。而由角化上皮组成的软腭，与上呼吸道的咽部相接，所以软腭的菌群常常包括上呼吸道的菌群成分。

（2）菌群组成：硬腭的优势菌群是口腔链球菌，而软腭虽然有一定数量的口腔链球菌，但常常包括咽部的正常菌群，如嗜血菌属、棒状杆菌属和卡他布兰汉菌等。提示在临床要把口腔黏膜及咽峡部黏膜的炎症性疾病联合考虑。

4. 舌

（1）特性：舌黏膜的舌背和舌腹部是解剖位置和理化性质差异较大的两个不同的生境。角化的舌背有很多乳头，对于微生物的滞留是有利的，口腔黏膜病的毛舌等部分疾病，丝状乳头过长，其中驻藏一些厌氧菌。沟纹舌的沟纹内也经常是微生物栖息之地。而舌腹部是光滑的黏膜表面，与唾液接触密切。

（2）菌群组成：唾液链球菌和革兰阳性的丝状菌是舌背的优势菌。韦荣菌也是舌背比较常见的细菌，资料表明，大鼠舌背的韦荣菌为优势菌，而且在牙周炎时，该菌数量明显升高。黏滑口腔球菌(*Stomatacoccas mucilaginous*)原名黏液葡萄球菌，该菌在舌背的定居数量约为可培养总数的3%～4%。在舌背部还常常分离到一定数量的拟杆菌。舌腹部受唾液菌群影响，其常驻菌波动较大。当某种原因引起口腔微生态失调时，丝状乳头过度生长，可致厌氧菌数量上升。当佩戴大基托或全口义齿1～2年后，由于义齿材料因素及清洁因素等，可引起白假丝酵母菌数量增高，患者可同时并发口角炎。

5. 牙龈

（1）特性：牙龈黏膜由围绕在牙颈部并紧密地覆盖牙槽嵴冠方的纤维组织组成。游离龈、附着龈和龈沟是不同的生态环境。而龈沟则是口腔微生物定植的重要生境，它是游离的边缘龈与牙根表面所形成V形缝隙，并且，该部位无上皮角化，是易受感染的薄弱区，也是非自洁的滞留区，该部位也常常是牙周炎早期发生的部位。牙周袋则是病理作用所致龈沟的加深。健康龈沟的平均深度为0.5mm左右，Eh约为100mV，一般无或少量龈沟液。而牙周

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

袋的深度>3mm以上或更深时，Eh随着袋深下降，一般在-100mV左右，可低至-300mV。

（2）菌群组成：龈缘的菌群通常与唾液菌群关系较密切。正常龈沟的优势菌是革兰阳性的球菌和杆菌，约占可培养菌总数的70%以上。这些细菌包括内氏放线菌、黏性放线菌、马氏棒杆菌、血链球菌和缓症链球菌等。厌氧的韦荣菌和其他革兰阴性厌氧杆菌（如口腔普雷沃菌、具核梭杆菌）也偶尔从正常龈沟分离出，但螺旋体的数量不多。然而，如果发生牙周炎时，牙周袋形成，袋内的牙石、软垢及细菌的种类数量发生显著变化。牙周袋是专性厌氧菌数量最多的生境，螺旋体和厌氧可动菌的检出比例在深袋相当高。

（二）牙齿

1. 特性　牙齿是口腔中非再生的高度矿化的硬组织。

（1）龈上牙面：主要指裸露于牙龈表面的牙面，包括𬌗面窝沟点隙和颊舌侧面及邻面。由于人们对牙周保健意识的加强，中老年人使用间隙刷，使牙齿的邻面也达到清洁，加之容易受唾液流动、食物摩擦、刷牙和含漱等口腔卫生措施的影响，使平滑面牙菌斑聚集量受到限制，光滑平面属于有氧环境，窝沟属于微有氧环境，但随着菌斑成熟，菌斑深层氧气密度下降，有利于厌氧菌生长定植。这也是易发生窝沟龋的原因。

（2）龈下牙面：由于有龈沟覆盖，使局部氧气密度降低，正常情况下，由于牙龈上皮附着于釉牙骨质界处，与牙表面封闭良好，因此微生物不能侵入。值得注意的是，两颗邻牙之间的根方，有一个生理性薄弱区——龈谷，该部位无上皮角化，是最易受损伤的部位，也是厌氧菌栖息的良好场所，常常是牙周病的始发部位。

2. 菌群组成　口腔微生物在牙面的定植是通过牢固附着在牙面的牙菌斑（dental plague）而实现。牙菌斑是附着于牙面上以细菌为主体的生态系统。不同部位牙菌斑的菌群组成有明显差异。

（1）龈上菌斑（supragingival plaque）：位于龈缘冠方的菌斑总称。

1）光滑面菌斑：以需氧和兼性厌氧的球菌为优势菌群成分，包括以血链球菌为主的口腔链球菌和奈瑟菌。随着菌斑的增殖和成熟，在菌斑的深层氧气密度下降，有利于厌氧菌生长。厌氧的革兰阴性杆菌的检出率也将增高。

2）𬌗面点隙沟裂菌斑：血链球菌、变异链球菌、黏性放线菌和韦荣菌是此生境的正常菌群成分。

3）邻面菌斑：在邻面菌斑的优势菌群除黏性放线菌、内氏放线菌和以血链球菌为主的口腔链球菌外，革兰阴性无芽胞的厌氧杆菌的定植数量明显高于光滑面和𬌗面点隙沟裂菌斑。龈谷区无上皮角化，易受损伤，也易受感染而形成慢性炎症，该部位以革兰阴性厌氧菌为主。

牙石：牙菌斑矿化而形成的钙化团块称为牙石。牙石也是口腔微生物在牙面或义齿定植的生态环境，优势菌群包括血链球菌、米勒链球菌、内氏放线菌、咽奈瑟球菌；厌氧菌有月形单胞菌、具核梭杆菌、小韦荣菌等。

（2）龈下菌斑（supragingival plaque）：位于龈缘根方菌斑的总称，位于龈沟和牙周袋内的菌斑，在生态学上明显区别于龈上菌斑。根据其与牙面的关系，可分为附着性龈下菌斑和非附着性龈下菌斑。

1）附着性龈下菌斑：附着在龈沟和牙周袋内相应的牙面上，以革兰阳性杆菌和球菌为主。此类菌斑不延伸到结合上皮，与龈下结石的形成、根面龋和根吸收有关。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

2）非附着性龈下菌斑：为结构疏松的菌斑团块，直接与龈下的上皮结合，从龈缘延伸到结合上皮。在病变活跃期以革兰阴性杆菌和螺旋体占优势，在病变静止期或牙周袋治疗后，则以革兰阳性和阴性球菌为主。牙周病实质上是内、外环境多种因素影响所引起的龈下菌群生态失调，表现为细菌的构成比的改变和绝对数量的增加。因此，牙周的微生态失调是牙周病发生发展的关键。

（三）唾液

1. 特性及来源　唾液不仅是口腔微生物定植的重要生态环境，而且口腔微生物可以通过唾液流动在每个生态位表面定植，口腔内大小唾液腺所分泌的唾液，进入口腔后与脱落的黏膜上皮细胞、白细胞、细菌和食物碎屑等混合，称为混合唾液或全唾液（whole saliva）。唾液的主要成分来自口腔内3对主要腺体：腮腺、下颌下腺和舌下腺。其中90%的唾液来自下颌下腺和腮腺；余下的10%来自舌下腺和其他口腔黏膜的小腺体。人每天唾液分泌总量为1～5L。

2. 成分　唾液的主要成分是水，占99%以上，有机物占0.5%，无机物占0.2%左右。

（1）有机物：蛋白质、尿素、氨基酸、糖、维生素等是唾液的主要有机成分。

1）蛋白质：唾液的蛋白质包括黏蛋白（mucin）、血清清蛋白、球蛋白和极少量的酶蛋白。黏蛋白是唾液的主要蛋白质，占唾液蛋白的75%，是早期牙菌斑形成的重要基质。唾液黏蛋白具有流变学性质，包括低溶解性、高黏性、弹性和附着性，这些性质使黏蛋白能聚集在口腔黏膜表面，并成为口腔黏膜的屏障，防止黏膜脱水，阻止口腔环境中的有害物质侵入人体。黏蛋白也起到一层天然防水作用，有助于维护处于水合状态下的口腔组织，保护下方细胞免受渗透压突然变化造成的损伤。酶类：①淀粉酶：唾液中最早发现的酶是淀粉酶，主要由浆液性腺泡产生。α-淀粉酶约占腮腺唾液量的30%。口腔淀粉酶的功能是增加含淀粉食物的溶解率，同时能除去牙齿周围和口腔黏膜上的食物碎片。经胃酸作用后淀粉酶失去活性，对进一步消化不起作用。②过氧化物酶-硫氰酸盐抗菌系统：多年来已经知道在牛奶、泪液和唾液中存在着能抑制某些细菌生长和产酸的因子，此后鉴定出这种物质为过氧化物酶，乳汁中的过氧化物酶称乳过氧化物酶，唾液中为唾液过氧化物酶。进一步研究发现，在健康人口腔中，唾液过氧化物酶活性主要是由唾液腺所分泌的过氧化物酶所致，但在感染组织及牙菌斑中，过氧化物酶活性可能是由髓过氧化物酶参与，髓过氧化物酶来自白细胞，唾液过氧化物酶和髓过氧化物酶在过氧化氢存在的条件下，能催化硫氰酸盐离子发生氧化反应：

$$\underset{\text{（硫氰酸盐）}}{SCN^- + H_2O_2} \xrightarrow{\text{过氧化物酶}} \underset{\text{（SCN 氰化中间产物）}}{OSCN^-}$$

硫氰酸盐氧化中间产物是二氰化硫[$S(CN)_2$]、氰亚磺酸（HO_2SCN）、氰磺酸（HO_3SCN）。它们都是强氧化剂，进入菌体后，阻断己糖激酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶等代谢通路，从而抑制细菌的增殖。唾液过氧化物酶-硫氰酸盐-过氧化氢抗菌系统主要是对需氧菌起作用，但也能抑制某些兼性厌氧菌生长。该系统的氧化物能抑制临床上常见的乳杆菌、链球菌和放线菌。过氧化氢酶阳性的细菌对SPS的抑制作用具有抵抗性。唾液中$OSCN^-$浓度大于100μmol/L时，就几乎完全抑制了一天龄菌斑，使之不能利用糖而产酸。中性pH时，$OSCN^-$占SPS氧化产物的99%以上，$OSCN^-$具有抗菌作用并对人体无害。③溶菌酶（LZ）：这是一种水解酶，存在于人类唾液和龈沟液中，还存在于人体各种分泌液和组织器官中。溶菌酶能水解细菌细

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

胞壁肽聚糖中 N-乙酰胞壁酸与 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β-1,4 糖苷键,使细胞膜变脆,易于破裂。LZ 活性在下颌下腺唾液中比在腮腺唾液中高,非刺激性下颌下腺唾液比刺激性唾液高。溶菌酶能与口腔天然菌群在口腔中共存也说明 LZ 对人类天然菌群没有太多破坏作用。

现已证实,LZ 为阳离子蛋白质,能介导细菌的聚离、破坏细胞膜、激活细菌的自溶素。LZ 是龈沟液中的主要抗菌成分之一,LZ 不仅具有溶菌作用,还具有抗炎、修复组织、抑制出血、使黏液分泌正常和增加抗生素效果等作用。LZ 也可与络合剂、过氧化氢、抗坏血酸等物质共同作用,从而溶解一些细菌。

2) 尿素和氨:尿素是唾液中降解最迅速的成分,尿素和氨是口腔微生物可利用的氮源。唾液中的尿素来自龈液和血清,氨则是细菌的代谢产物。氨的出现使 pH 值上升,储存的氨可防止局部 pH 值下降,阻止龋病发生。

3) 氨基酸:唾液中含有 18 种氨基酸,游离氨基酸的含量约 3.44 ~4.78mg/100ml 唾液,常见的氨基酸有:天门冬氨酸、谷氨酸、苏氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。肽和蛋白质也是氨基酸的来源。

4) 糖类:唾液中的大多数糖类来自宿主的食物,如蔗糖、葡萄糖和麦芽糖。麦芽糖是唾液淀粉酶水解淀粉的产物。唾液中所含游离的糖类来自腺体分泌液,其含量约为 0.5mg/100ml 唾液。

5) 维生素:混合唾液中所含的维生素主要是 B 族维生素。B 族维生素是大多数口腔微生物(特别是口腔链球菌)生长所必需的基质。这些 B 族维生素主要来源于宿主食物,有少量是细菌的代谢产物,如白假丝酵母菌合成维生素 B_1、泛酸和尼克酸。正常唾液中维生素 A 的含量很低或无。维生素 C 的含量也比全血、尿液和胃液低。

6) 乳铁蛋白:乳铁蛋白(LF)是中性粒细胞和腺上皮组织合成的一种与铁结合的蛋白质,胃和十二指肠上皮细胞也能合成 LF。LF 广泛见于人类分泌液中,包括唾液、泪液、乳液、精液、胆汁和滑膜液。LF 能抑制细菌生长,在体外实验中证实,它能结合培养基中的铁,使铁浓度低于细菌生长所需浓度,从而达到抑菌作用。在生长过程中需铁的微生物对 LF 特别敏感。LF 靠其结合铁的能力抑制细菌生长。LF 除了抑菌作用外,还具有直接杀菌作用。传统认为其杀菌作用主要取决于其结合铁的能力。但有些研究证实,LF 被铁饱和后,对细菌生长和代谢仍有作用。目前证实有许多微生物对 LF 敏感,这些微生物包括革兰阳性菌和革兰阴性菌、需氧菌、厌氧菌和酵母菌。它们是变异链球菌、唾液链球菌、缓症链球菌、假单胞菌、非致病性大肠埃希菌、霍乱弧菌和白假丝酵母菌。

(2) 无机盐类:唾液中的主要无机盐类包括钠、钾、氯、磷、氟等。钙、磷酸盐和氟化物的含量与牙石形成和龋齿的产生有关。氟的含量很低,一般不超过 2ppm。碳酸氢盐则是唾液的主要缓冲剂,约占容量的 64.85%。

3. 菌群组成　成人唾液可培养菌总数为 6×10^9/ml 唾液。口腔链球菌是唾液的优势菌群,约占唾液可培养菌的 50% 左右,其中以唾液链球菌和缓症链球菌最多见。革兰阳性的丝状菌和棒杆菌、诺卡菌和放线菌也是唾液的正常菌群成分。唾液中还包括一定数量的韦荣菌、奈瑟球菌、乳杆菌、梭杆菌、拟杆菌、酵母菌和原虫,都可能在唾液中检出,但数量不多。有学者报道,在牙周病患者唾液中韦荣菌数量较健康人明显增高,差异具有显著性。有关韦荣菌研究的资料不多,但提示该菌在牙周病或龋病中不可忽视。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（四）义齿和其他口内矫治装置

1. 特征　由于牙的丧失或牙列畸形、咬牙合异常等原因，在口内使用义齿或其他矫正器，其结果形成新的生态环境或滞留区，可能产生正常菌群的动态变化。

2. 菌群组成　由于义齿和矫正器的类型、形状以及所用材料的差异，定植微生物的组成可能受到影响。丙烯酸材料较金属冠或玻璃陶瓷更易沉积牙菌斑。白假丝酵母菌和乳杆菌很容易在丙烯酸酯托牙的表面和基托上附着定植，形成"基托白斑"。Turrell 报道，患义齿性口炎的患者，由于义齿能阻碍舌的机械性清洁效应，并阻断或影响带有抗微生物因子的唾液自由流动，从而改变口腔内的环境条件，使微生物易于沉积在活动义齿基托表面及黏膜上，最后导致义齿性口炎。

义齿基托材料（甲基丙烯酸甲酯）能引起局部刺激和过敏反应。Weaver 等认为树脂基托中残留的 1-甲基丙烯酸甲酯单体是一种原发性刺激物，可直接快速诱发组织炎症反应，该反应仅局限于直接接触区。Riekles 等证明其原因是由于单体聚合不全，残留于树脂中所致。也有"热凝塑料接触性口炎"的报道。

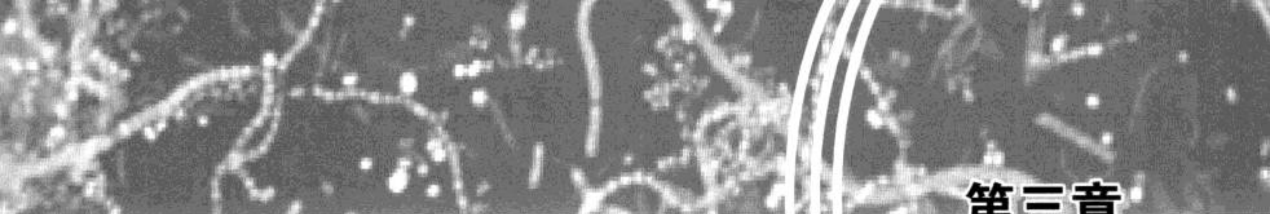
义齿及矫治装置对口腔来说，属于异物，带给口腔机械、化学、免疫等方面的刺激，是近来学者们研究的一个热点。

（马晟利）

参考文献

1. 康白. 微生态学原理. 大连：大连出版社，2002
2. 岳松龄. 现代龋病学，北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1993
3. 肖晓蓉. 口腔微生物学及实用技术. 成都：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1993
4. 马晟利. 医学口腔微生态学. 哈尔滨：黑龙江科学技术出版社，2001

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



第三章

口腔微生物群的演替

口腔是人体与外界相通的重要器官之一，食物通过口腔进入机体的同时也为机体带来了各种纷繁复杂的微生物，这些微生物在口腔定居下来，形成了机体重要的微生态系统。这个微生态系统的建立、存在和发展与口腔的结构、机体的免疫状况、个人的生活习惯等诸多因素息息相关。

口腔包括很多组织器官，如唇、面颊、腭、牙齿、齿槽骨、上颌骨、下颌骨、舌骨、颧骨、颞颌关节、腮腺、下颌下腺、舌下腺及这些器官上的肌肉、神经、血管等，与微生态关系密切的组织是口腔内的黏膜系统。除牙齿外，口腔所有器官都被黏膜覆被。黏膜的结构类似皮肤，但在湿润性、角化程度及附件构成上与皮肤不同。口腔黏膜上皮的种类为复层鳞状上皮。

口腔有 3 对唾液腺开口于口腔黏膜表面，分泌唾液。唾液中的成分对口腔微生物的种类和数量也有较大影响。口腔是一个复杂的生态环境，有合适的温度与湿度，口腔黏膜和牙齿表面都适于许多微生物的生长与繁殖。口腔内的天然菌群与人类机体有着共生的关系，口腔微生物的特点是数量相对较少、种类相对简单。当口腔的功能发生紊乱，机体健康受到影响时，口腔内的生态环境受到破坏，疾病就会发生。

微生态演替是指正常微生物群受自然或人为因素的影响，在微生态空间中发生、发展和消亡的过程。正常的生理性演替往往出现在机体出生时的定植和定植菌与外来菌的竞争。食物结构发生变化，也导致生理性演替。抗生素、激素、放射性核素、疾病状态或免疫功能低下、外部环境变化、感染等应激状态则导致微生态的病理性演替。定位转移是指微生物群离开其原籍，游动到其他部位或环境且能定植下来。在一个生态区域内，有外籍菌定植，就意味着生态失调。

口腔中最常见的菌群是甲型链球菌和厌氧链球菌，其次是表皮葡萄球菌、奈瑟菌、乳杆菌、螺旋体、假丝酵母等。这些定植菌群是在长期历史进化过程中形成的，与宿主的共生关系极为密切，对宿主是有益菌，也称为固有菌群。固有菌群的定植是微生物与宿主两方面共同的遗传学机制决定的。定植则依靠微生物对宿主的特异性黏附，定植后需要大量繁殖以占据菌种优势，还要抵抗其他微生物的竞争以及耐受宿主的免疫屏障作用。在正常情况下，口腔微生物与宿主口腔处于生态平衡状态。但由于体内、外环境因素的影响，可导致口腔内微生物菌群失调。正常口腔微生物若出现生态失调的变化，将出现各种口腔疾病，龋齿和牙周病就是口腔生态失调最常见的疾病。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第一节　口腔微生物的来源

人出生时，机体的口腔是无菌的，但在几小时到一天之内，口腔内即可出现一些菌群，这些菌群大多来自于母体，且为需氧菌。新生儿口腔内因无厌氧环境，所以很少有厌氧菌定植，口腔的局部厌氧环境出现后才开始有厌氧菌定植。韦荣球菌是最早在口腔内定植的厌氧菌，约出现在第6天的新生儿口腔中。在成人口腔中，微生物群以需氧和兼性厌氧菌为主，唾液的细菌群至少由三十多种菌属组成，而这些细菌大多数来自口腔黏膜。在牙菌斑生物膜及牙龈沟中，细菌计数约为10^{11}CFU/克湿重。尽管完整的口腔黏膜和牙龈组织可抵抗病菌的侵袭，但在口腔黏膜病伤时，或在口腔治疗伤及黏膜、牙龈沟底的上皮组织时，都会使微生物进入深层组织中造成口腔感染。

第二节　口腔微生物的演替

一、生理性演替

（一）无牙期口腔微生态系统

新生儿及无牙婴儿口腔中的早期定植微生物主要为各种链球菌。新生儿出生后第1天即可检出其口腔的早期定植菌，包括唾液链球菌、米勒链球菌、口腔链球菌、表皮葡萄球菌等。乳牙萌出之前可检出奈瑟菌、韦荣球菌及念珠菌的存在，其中1月龄婴儿口腔中假丝酵母的检出率较高。随着月龄的增加，其口腔中的微生物趋于多样化。不同喂养方式对乳牙萌出前婴儿口腔微生物无明显影响，而可能与婴儿的饮食习惯、口腔卫生措施、健康状态及其父母口腔的优势微生物有关。

新生儿口腔菌群来自母体生殖道。新生儿在出生时通过母体生殖道可能会携带一些母体生殖道的正常细菌，如乳链球菌和乳杆菌，并且在出生后一天的新生儿口腔中有一定量的检出。但随着出生时间推移，这些细菌逐渐消失，说明母体生殖道正常菌群对新生儿口腔菌群的影响有限，仅为过路菌。新生儿口腔中的菌群大多来自于食物和皮肤表面。

新生儿口腔中，细菌首先黏附于黏膜表面，在此基础上开始建立口腔正常微生物群。新生儿出生后第1天即有唾液链球菌和米勒链球菌从其口腔检出。随着月龄的增加，其检出率和数量均明显增加，且为优势菌。表皮葡萄球菌是检出频率很高的需氧菌，但该菌在数量上不占优势。表皮葡萄球菌本身是人类皮肤上的正常细菌，在多数健康婴儿口腔检出的原因可能与母乳喂养时婴儿口腔接触母亲乳房和婴儿喜欢吮指有关。新生儿口腔中检出最多的厌氧菌为韦荣球菌，该菌同时也是新生儿口腔中最早定植的厌氧菌。在无牙婴儿口腔中可能有念珠菌存在，新生儿口腔中定植的高峰是在出生后1个月左右，因此1月龄的新生儿应预防念珠菌感染。

（二）乳牙期口腔微生态系统

乳牙的萌出使口腔解剖结构发生了变化，特别是口腔滞留区的增加，如龈沟、牙咬合面的点隙沟裂、牙邻面等，给微生物提供了更多、更复杂的定植生境。微生物的种类和数量也较新生儿期增多，特别是兼性厌氧菌和厌氧菌增加。血链球菌、变异链球菌、放线菌、乳杆菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的定植和增加是乳牙期幼儿的菌群特点。血链球菌只能在牙萌出后的牙面检出，变异链球菌必须在血链球菌定植后的生境中定植。变异链球菌的定植及大量增加，使幼儿期成为龋病发生的高发期。专性厌氧的梭杆菌，一般在乳牙萌出后即可分离到。

没有微生物就没有龋病，微生态环境在龋病发病过程中起主要作用，与龋病发生有关的细菌都是口腔正常微生物群。由于局部的、全身的和(或)食物因素的改变，可引起口腔生态环境的变化，从而使正常细菌与宿主之间的生理性组合改变为病理性组合，口腔生态平衡转化为生态失调，正常细菌成为条件致病菌而引起龋病。

(三) 恒牙期口腔微生态系统

机体处于青春期和成人期时，由于恒牙完全萌出，口腔解剖结构处于相对恒定的状态，口腔微生物群也达到演替的峰顶，处于一个相对稳定和持续的高峰群落期。在青春期，口腔内定植的微生物数量最多、种类最复杂，唾液细菌的数量可从幼儿期的10^9～10^{11}CFU/L，升高到10^{13}～10^{16}CFU/L，而细菌种类可高达600多种。厌氧菌的大量定植和数量的增加是青春期菌群的另一特点，青春期牙龈炎的高发病率与这些厌氧菌的增加有关。在青春期和成人期口腔内，梭杆菌、普雷沃菌、卟啉单胞菌、二氧化碳噬纤维菌、螺旋体、消化链球菌、放线菌、优杆菌是最常见的厌氧菌。青春期单纯性龈炎、青少年牙周炎以及成人期牙周炎发病率的增高，与口腔中产黑色素的革兰阴性的厌氧杆菌、梭杆菌、螺旋体的数量明显增多有关。

机体进入老年期，由于受牙列松动、丧失，咀嚼功能及唾液分泌功能下降等因素的影响，老年口腔中微生物群会发生变化。老年口腔菌群不仅数量有所下降，而且种类也有所改变，革兰阴性厌氧杆菌和假丝酵母增高是一重要特点。假丝酵母增多是Newton氏Ⅱ型和Ⅲ型义齿性口炎的主要病因，而产黑色素厌氧杆菌的增多是老年人牙周炎和冠周炎多发的重要原因。

(四) 口腔微生物演替机制

在正常情况下，口腔微生物之间、微生物与宿主口腔之间处于生态平衡状态。由于体内、外环境因素的影响，可导致菌群失调。一些细菌过盛增殖，正常口腔微生物失去生理组合，即产生生态失调的变化，导致疾病。生态失调与口腔疾病的发生密切相关，口腔常见病——龋齿和牙周病就是口腔生态失调的表现之一。龋齿是牙面局部环境、细菌和食物相互关系失调的表现。龋病活跃者，局部环境因素改变，包括滞留区增加，唾液分泌减少，使牙面聚集的细菌增加，再加上大量蔗糖的摄入，使牙面微生态发生明显变化，变异链球菌等产酸菌的数量增多，产生大量有机酸而致使釉质脱钙，形成龋洞。牙周病是发生于牙周支持组织的一种疾病，由内、外环境多种因素的影响导致龈下牙菌斑生态失调所引起的，表现为细菌构成比的改变和绝对数量的增加。此外，牙髓、根尖周疾病和一些口腔黏膜病，也是口腔菌群间生态平衡失调所致。如口腔内白假丝酵母的大量增殖引起的口腔溃疡。

影响口腔微生物群的因素很多，主要包括口腔卫生、饮食、酸碱值(pH)、氧化还原电位(Eh)、细菌的黏附和集聚、微生物之间的相互作用等等。口腔卫生措施如刷牙、漱口、使用牙膏等，可使口腔内的细菌总量减少。而口腔卫生不良者，菌斑量和细菌量增多，特别是厌氧菌及腐败性细菌增多。摄入高蔗糖食物，使口腔内变异链球菌数目明显增加；摄入高蛋白食物，可使革兰阳性杆菌数量增加，因此饮食习惯也与口腔微生物的演替息息相关。pH酸碱值透过对细菌酶活性和细胞分裂的作用来影响细菌的生长、繁殖。牙菌斑内，产酸菌发酵糖产酸，使菌斑pH下降，利于耐酸菌的生长。pH是确定牙菌斑生物膜生态系的重要因子。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

各种口腔微生物对氧化还原电位 Eh 有不同的要求，需氧菌需正值 Eh。此外，细菌代谢形成的还原终末产物可使 Eh 降低，所以，在菌斑形成过程中伴有 Eh 的降低。此结果显示出牙菌斑生物膜随时间的推移，从有氧环境变为厌氧环境，与此改变相应的，是菌群的组成从需氧菌占优势变为兼性菌占优势，最后为厌氧菌居主导。细菌对口腔组织表面的黏附能力是细菌在口腔内分布的重要生态确定因子。而细菌间的集聚，使对口腔组织表面缺乏黏附能力的细菌，可存留在口腔中，参与口腔微生态系。口腔正常菌群之间以共生为主，它包括细菌间提供黏附因子和重要的生长因子。口腔微生物间还存在相互制约作用，它主要包括竞争营养物质和空间位置，而且一些微生物可产生一些抗菌物质，如细菌素等。机体的口腔微生物演替受到多种因素的影响，包括宿主的免疫、生理、内分泌、全身疾病、唾液分泌、药物、嗜好（烟、酒等）、种族与遗传及口腔疾病等，均可影响口腔微生物的组成定居和相互关系。

口腔环境中存在的正常微生物群对口腔健康和疾病的发生起着重要的作用。一般情况下，口腔正常菌群是不造成疾病的，只有在口腔微生物环境发生紊乱的情况下，使一些细菌大量繁殖，口腔正常微生物间产生菌群失调，才会对宿主造成损害，发生疾病。所以，要预防和治疗口腔疾病，首先应该考虑微生态学的规律，采取生态调整措施，建立口腔的正常生态平衡，而不能采取将口腔内所有微生物消灭的手段。

二、病理性演替

在由非生理性因素所引起的宿主病理性改变状态下，微生物易位或易主的变化过程称为病理性演替。微生物的病理性演替在口腔内多见，这可能与口腔所处的特殊的生态位置有关。外伤引起的牙折可因牙髓暴露而导致牙髓感染，使原来无菌的牙髓中定植各种兼性厌氧和专性厌氧的球菌、杆菌；由于牙周卫生状况较差导致细菌积聚和厌氧菌过度生长所引发的龈炎，或因创伤引起的牙周病原菌的易位导致牙周袋的形成、牙周炎的发生和发展；或细菌过度生长，酸蚀牙面、脱矿引起的牙龋患；或拔牙后感染所致干槽症、白假丝酵母所致黏膜感染等，均为口腔微生物的病理性演替。

病理性演替主要是以口腔定植微生物即原籍菌群为主的演替过程，表现为正常微生物组成和数量的异常变化和易位。这种易位可以是近距离的，即在口腔生态区内的不同生境间；也可以是远距离的，即在口腔生态区外的易位。如龋病患者及拔牙患者产生的菌血症，可在细菌性心内膜炎患者血中检出变异链球菌及血链球菌。病理性演替可以是永久性的、不可逆的，也可以是暂时性的，如牙周的洁刮治术、龋洞充填修复等可以减缓或中止这一病理性演替。

牙周病与龋病是口腔主要的感染性疾病，其危害在于造成牙齿破坏、松动脱落，破坏咀嚼器官完整性，引起发音、口腔功能和面部形象变化。牙周炎的病因除通常所见的菌斑牙石等局部因素外，还受到全身健康状况的影响。研究表明，这种影响并非是单向的，其中以牙周炎与糖尿病的双向关系尤其受到关注。

糖尿病患者牙周炎发病率高于正常人，且往往发病更重。糖尿病治疗及时，血糖控制良好，牙周炎可随之减轻；反之，常会伴发重度牙周炎或难治性牙周炎。其次，牙周炎的发生往往会进一步加重糖尿病病情。牙周状况控制好者则血糖控制相对良好，糖尿病病情稳定；反之，则难以有效降低血糖，易使病情恶化，严重者还会引起各种并发症，成为不可逆性的改

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

变，导致患者病残或死亡。

糖尿病和牙周炎之间存在着双向关系。不论内科医生还是口腔科医生都应对患糖尿病的牙周炎患者给予足够重视，在控制糖尿病的同时须考虑控制牙周感染；反之，糖尿病的治疗也是取得有效牙周炎治疗效果的重要前提。

（谢铁　肖晓蓉　贾文祥　宋志军　吴红）

参考文献

1. 周学东. 实用口腔微生物学与技术. 北京：人民卫生出版社，2009
2. 李兰娟. 感染微生态学. 北京：人民卫生出版社，2012
3. Marsh PD, Martin MV. Oral Microbiology. Elsevier, Churchill Livingstone, 2009

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第四章

口腔正常微生物群

第一节　口腔微生物组

人类微生物组(Microbiome)是指那些占据人体空间的生态区中共生、共栖和致病微生物遗传信息的总和。自从人类基因组计划在2003年完成以后,许多科学家认为解密人类基因组基因并不能完全掌握人类疾病与健康的关键问题,因为人类对自身体内存在的占据着人体细胞组成的90%、编码超过人体基因组100倍基因信息的共生微生物菌群几乎一无所知。因此,美国国立卫生研究院(NIH)于2007年底宣布正式启动一项新的基因工程——人类微生物组项目(Human Microbiome Project,HMP)。HMP是人类基因组计划的延伸,由美国、欧盟国家和中国等十几个国家参加,该计划正使用新一代DNA测序仪进行人类微生物组DNA的测序工作,目标是通过绘制人体不同器官中微生物宏基因组图谱,解析微生物菌群结构变化对人类健康的影响。该项目旨在研究人体5个主要的微生物定植点:口腔、鼻腔、肠道、阴道和皮肤的微生物(包括细菌、古细菌、真菌、寄生虫和病毒)的基因和基因组,建立微生物参考基因组的数据库。通过示范项目将从患有特定疾病的志愿者体内获得样品,从而可以将微生物组在人体特定区域的存在及变化情况与特定的疾病之间建立联系。研究人员认为不用完全弄清楚微生物群体的全部信息,也有可能理解微生物在疾病和健康中的作用。

微生物在口腔有多个定居点,如牙齿、龈沟、舌头、颊部、硬软腭、扁桃体等。超过600多种口腔微生物定居在特异位点。大多数的口腔微生物是条件致病菌,即在环境或个人口腔卫生发生变化时触发它们成为致病的微生物,并由此导致龋病、牙周病的发生。随着人类微生物组项目的开展,高通量基因组测序技术的发展促进了微生物全基因组序列信息的获得,并促使口腔微生物组学的研究经历了一次革新。目前,已经建立了口腔微生物参考基因组的数据库——人类口腔微生物组数据库(Human Oral Microbiome Database,HOMD)。对口腔细菌的类型、新陈代谢情况、致病能力等进行了详细记录,作为研究者查看和检索口腔微生物群信息、形成新的科学假设和获得计算发现的重要搜索引擎,相当于一个数字化的口腔微生物牛津词典。至今,HOMD记录了1门古菌12门细菌组成,共179属645种原核生物,其中大部分是不能培养并未经命名,通过16S rRNA序列进行识别。优势分类群是厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、螺旋体门和梭杆菌门等(表4-1)。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

表 4-1　人口腔微生物组数据库(HOMD)组成概况(>5 种的菌属)

门	优势属	代表种
厚壁菌门(229 种)	链球菌属(41 种)	变异链球菌
	月形单胞菌属(22 种)	牙周病月形单胞菌
	乳杆菌(21 种)	嗜酸乳杆菌
	支原体(9 种)	口腔支原体
	嗜胨菌属(6 种)	不解糖嗜胨菌
	韦荣球菌属(5 种)	小韦荣球菌
	戴阿李斯特菌属(5 种)	侵肺戴阿利斯特菌
变形菌门(111 种)	奈瑟菌属(20 种)	干燥奈瑟菌
	嗜血杆菌属(7 种)	流感嗜血菌
	弯曲菌属(7 种)	简明弯曲菌
	聚集杆菌属(7 种)	伴放线菌聚集杆菌
	假单胞菌属(6 种)	铜绿假单胞菌
	金氏杆菌属(5 种)	口腔金氏菌
拟杆菌门(109 种)	普雷沃菌属(50 种)	产黑色素普雷沃菌
	二氧化碳噬纤维菌属(18 种)	黄褐二氧化碳噬纤维菌
	卟啉单胞菌属(12 种)	牙龈卟啉单胞菌
	拟普雷沃菌属(5 种)	灰色拟普雷沃菌
放线菌门(81 种)	放线菌属(29 种)	黏性放线菌
	丙酸杆菌属(7 种)	痤疮丙酸杆菌
	奇异菌属(7 种)	小陌生物菌
	棒状杆菌属(6 种)	白喉棒状杆菌
螺旋体门(49 种)	螺旋体属(49 种)	齿垢螺旋体
梭杆菌门(35 种)	纤毛菌属(20 种)	颊纤毛菌
	梭杆菌属(11 种)	具核梭杆菌
互养菌门(10 种)	优克特菌属(8 种)	人优克特菌
SR1(3 种)		oral taxon 345
TM7(12 种)		oral taxon 346
衣原体(1 种)		肺炎衣原体
绿弯菌门(1 种)		oral taxon 439
GN02(3 种)		oral taxon 871
广域古菌门(1 种)		口腔甲烷短杆菌

一、口腔细菌组

研究微生物与疾病的关系,首先要确立健康状态下的微生物组并作为基准。HMP 项目组招募了 242 个健康人,收集了肠道、口腔、呼吸道、皮肤、阴道等 15~18 个位点的样品,用 16S rRNA 测序产生了 5177 个微生物分类群。发现即使在健康个体间,每个栖息地的标记微生物(signature microbes)多样性和丰度差异很大,在个体内和个体间具有强烈的生境特异性。身体各部位微生物群落也完全不同(图 4-1),口腔内的微生物与人体其他与外界相通的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

腔道不一样，口腔内牙齿上的微生物与唾液中的也不同。在口腔各部位，以链球菌、嗜血杆菌、普雷沃菌、韦荣球菌所占比例最大；在龈上和龈下菌斑中，棒状杆菌属细菌数量也相对丰富。不管群落结构如何变化，宏基因组中的代谢途径相关基因是稳定的。种族差异与微生物组组成和代谢途径基因最密切相关。

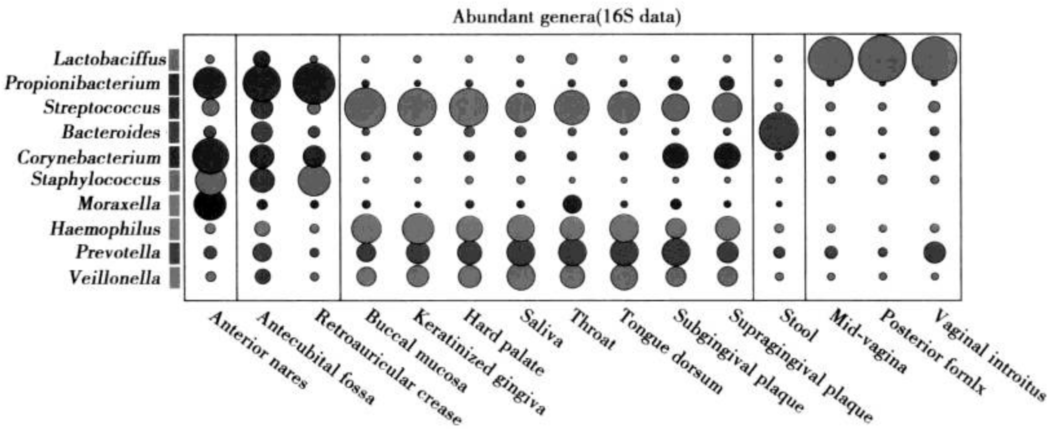


图 4-1 人体各部位微生物组丰度差异

注：此图来自文章：Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature, 2012, 486(7402): 207-214

人们也试图描绘非疾病状态下的口腔微生物组情况，通过评价口腔微生物组的水平层面不同个体多样性、不同时间阶段导致的纵向变化趋势、食物和地理位置的影响能否导致种属转换等，从而确定口腔核心微生物组种类，以此加深对口腔微生物组的变化与口腔健康状况关联的理解。

（一）横向和纵向水平的口腔细菌组分布

通过在全球范围 12 个国家地区对 120 例健康人群的唾液微生物群进行分析，得到了 14 115 个 16S rRNA 序列，这些序列分属于 101 个已知的细菌基因属，但其中 39 个是以前从没有被描述过的口腔菌属。另外，还有 64 个未知种属被发现。研究发现每个人的唾液细菌组成都是独特的。唾液微生物组由于个体的不同在组成上存在巨大差异，但多样性几乎不受地理结构的影响。如果进一步对不同的饮食等因素进行控制，可能会进一步降低地区之间的差异。这项研究为进一步研究人体微生物组的多样性提供基本框架，并且为研究环境、饮食和遗传因素等对个体微生物的影响奠定了基础。另外，研究 10 个健康人群的口腔微生物组项目中，采集了特定牙齿的龈上和龈下菌斑、唾液等 26 个样本，将其混合，通过测序鉴定了 9 个门的 247 种细菌，有 15 个种属的细菌存在于 10 个个体中，但在种、株水平上存在明显的个体差异。将这些口腔细菌序列与先前报道的大肠和粪便中的细菌比较，发现口腔、肠道驻扎着独特的细菌集，它们在属的水平而不是种的水平存在显著的差异。

在水平层面的研究提示不同个体的口腔微生物组存在巨大差异，那么，同一个体不同时期、不同的年龄阶段这种纵向趋势的口腔微生物组成又如何呢？一项研究采集 5 个健康个体连续 29 天 3 个不同时间点（上午 10～11 点间）的口腔唾液样本，测序分析结果显示口腔微生物组主要由 7 个门的细菌组成，拟杆菌门、厚壁菌门是不同时间同一个体内组成最相似

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的菌群，梭杆菌、螺旋体在所有个体中都能检测出，但在某些时间点并不能测出。孪生球菌属在所有个体的所有时间点均能检测到，但目前还并没界定为口腔核心微生物。作者推断唾液微生物组在一个时期（至少5天）可能是稳定的，唾液采集的间隔时间越近，并不一定比间隔时间久的样本微生物组更相似。另一组人员研究了74例3～18岁青少年的唾液微生物组成，根据牙列阶段将孩子分成4组，研究乳牙到恒牙的转换与微生物组成与口腔健康的关系。用454测序鉴定了8个门113个分类群的细菌。乳牙定植着更高比例的变形菌门细菌，而在其他年龄组，变形菌门和拟杆菌门细菌丰度一样。随着年龄的增长，拟杆菌、韦荣球菌、螺旋体和TM7数量增加，这反映微生物组的变迁随年龄等生物学改变而变化。

（二）口腔不同生境细菌多样性

1. 唾液　每毫升唾液中平均含有1.4×10^8个细菌，主要分属7大类：厚壁菌、变形菌、拟杆菌、放线菌、TM7、梭杆菌和螺旋体；其中，厚壁菌、变形菌、拟杆菌及放线菌含量最高；TM7、梭杆菌其次；螺旋体含量最低。不同个体唾液微生物之间存在着差异；同一个体的唾液微生物组成在一定时间内具有稳定性，但是唾液微生物没有明显的地理分布特征。唾液微生物组中特异性致病菌的出现或者微生物分布的变动可能在疾病症状出现的早期诊断中发挥重要作用：龋病、牙周炎、口腔鳞状细胞癌、胰腺癌患者的唾液中均有与健康人群分布不同的细菌存在。唾液中铁离子含量不足可导致感染性心内膜炎相关的α溶血细菌成为优势菌，增加感染性心内膜炎的潜在风险。

2. 菌斑　龈上菌斑是位于牙龈缘以上的牙面菌斑，是导致龋病发生的始动因素。健康人群龈上菌斑中细菌的种类丰富，从98个健康成年受试者的龈上集合菌斑中发现了大约6888种细菌，厚壁菌、放线菌为龈上菌斑的优势菌。不同健康状态的牙体组织表面的龈上菌斑其组成存在差异。以龋病发生过程的不同阶段为例，健康釉质表面、白垩斑表面甚至龋损表面的菌斑菌群组成明显不同，不仅群落组成的多样性逐渐降低，且优势菌也存在差异。对根面菌斑的研究也得出了类似的结果。同样的，由于釉质与根面牙骨质或牙本质组成成分理化性质的不同，我们可大胆推测在同一牙齿釉质及根面形成的菌斑组成是存在差异的，当然，这一推测需要实验研究以证实。同样需要验证的，还包括不同年龄人群的龈上菌斑组成之间的差异。

龋病与龈上菌斑密切相关。宏基因组研究认为杆菌属、γ-变形菌门细菌（主要是凝集杆菌、嗜血菌）、罗斯菌属、凝集菌属是无龋人群的优势菌，β-变形菌门（主要是奈瑟菌）和TM7在龋病样本中比例很低，但它们的存在是否同健康相关还需要大样本研究。以前的研究认为变异链球菌可能是龋齿的主要致病菌，乳酸菌、放线菌等也与龋病有关。最近焦磷酸测序龈上菌斑，数据显示龋齿样本中并不是变异链球菌占优势，而是10余种细菌的混合群落，如韦荣球菌属、棒状杆菌属、纤毛菌属、丙酸菌属和阿托波氏菌等，而典型厌氧类群（如梭杆菌、拟杆菌、普雷沃菌等）也常出现在龋病样本中，这同龋病是多种微生物协同致病的观点吻合。

龈下菌斑与牙周组织的验证性破坏密切相关，关于该生境微生物研究多集中于牙周疾病发生时组成的改变。牙周病原菌主要聚集在龈下菌斑，其种类繁多，超过400多种，并不是每种细菌都有清楚界定的功能，而是不同的细菌功能高度重复。厚壁菌门（包括链球菌属）的细菌最容易在牙周位点检测到。与以前观点不同的是，在牙周位点占据优势地位的是革兰阳性菌而不是革兰阴性菌。在顽固性牙周炎、严重牙周炎患者的口腔菌种类明显比健康者多，包括人们目前认为的牙周致病菌，例如微小消化链球菌、纤细弯曲菌，缠结优杆菌、

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

新月形单胞菌等也明显增多，某些新种如 TM7、OT346/356、OT272/274 等的分布也异常增多。

3. 口腔黏膜　与口内其他生境相比，定植于黏膜的微生物多样性相对较低。舌部由于定植了大量与口臭相关的菌群而受到研究者的关注。健康人群的舌背定植了较多的唾液链球菌、黏液罗氏菌和一种未确认种类的可培养的优杆菌。

二、口腔真菌组

真菌(fungus)是一种真核细胞型微生物，菌体较细菌大，结构较细菌复杂，有典型的细胞核和完善的细胞器，细胞壁不含肽聚糖，主要由多糖(75%)和蛋白质(25%)组成。真菌可分单细胞和多细胞两类。单细胞真菌呈圆形或卵圆形，称酵母菌；多细胞真菌可见菌丝和孢子，交织成团呈丝状，称为丝状菌或霉菌。

健康人的口腔中也存在数量丰富的真菌。对 20 例不同性别、种族的健康人漱口液中真菌进行多标签的焦磷酸测序，得到口腔真菌基因组(oral fungal microbiome 或 mycobiome)信息：口腔包含 74 个可培养的和 11 个不可培养的真菌属。除了某些相同的种属外，大量的种属如 39 属只在 1 人口腔中检出，16 属在 2 人中检出。假丝酵母菌是检出率最高的(75%)，其次是分子孢子菌属(65%)、短梗霉属(50%)、酵母属(50%)、曲霉属(35%)、镰孢菌属(30%)、隐球菌属(20%)等(图 4-2)。4 个优势菌属对人具有致病性。在可培养的菌属中，有 61 属真菌仅有一个代表种，13 属真菌有 2～6 种，具体说来，曲霉属 6 种，念珠菌属 5 种，分子孢子菌属 4 种，镰孢菌属 3 种，青霉菌属 3 种。总共被鉴定的细菌多达 101 种，每个个体的种类在 9～23 种之间。低丰度的真菌种属可能来自于空气或食物中的环境真菌。主成

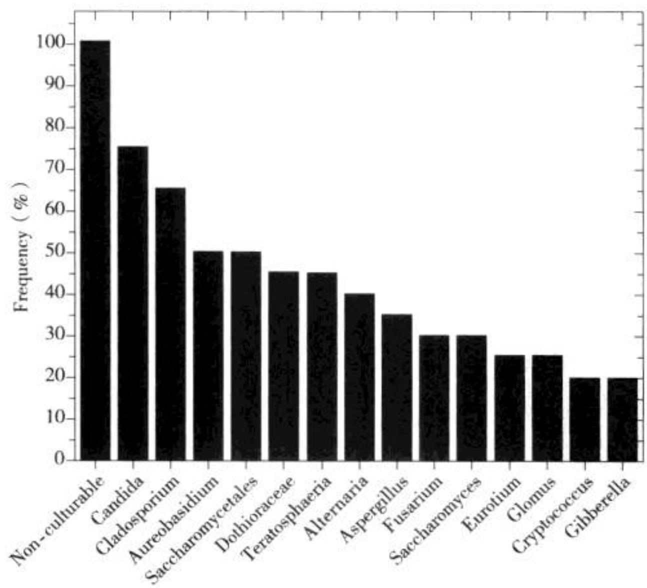


图 4-2　真菌属检出率(>20%)分布图

注：此图来自文章：Mahmoud A, Ghannoum, Richard J, et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. PLOS pathogens, 2010, 6(1): 1-8

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

分分析揭示真菌组和性别、种族有关系：白种男人和亚洲男人聚类不同，而亚洲人和白种女人聚类相同。

检出率最高的假丝酵母菌包括白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌、都柏林假丝酵母菌等，其中最多的、毒力最强的是白假丝酵母菌。

三、口腔病毒组

病毒(virus)是最微小、结构最简单的微生物，必须在活细胞内方可显示其生命活性。

病毒是丰富的感染源，是生态系统多样性的重要驱动者。相比环境中病毒多样性而言，人体病毒组多样性相对较低，估计有1500种基因型，病毒分布不均匀。高达90%病毒未知，8%以噬菌体形式存在，另有2%是真核细胞病毒。环境和人体样本中每个微生物细胞有7～10个病毒样颗粒(viral-like particles，VLP)，因此预测人体大概有10^{15}噬菌体。运用荧光显微镜技术直接计数病毒，显示人体大概有3×10^{12}病毒。其中在口、鼻、咽部位，每毫升液体中有2.1×10^{8} VLP，总共有1.2×10^{10}病毒，包括250种基因型；牙齿周围组织总共有3.0×10^{9}病毒，基因型数量尚不得而知(表4-2)。在收集了5个志愿者2～3个月期间的唾液样本后，采用宏基因组方法从整体上对口腔病毒组进行分析，唾液中的病毒群落主要以噬菌体的方式存在，而噬菌体的成分是瞬时不同的。同一家庭的两个独立个体共享的大量群落显示环境因素是病毒群落组成的决定因素。唾液病毒组也不同于人粪便和呼吸道病毒组，这也进一步显示了栖息地在塑造人病毒组成的重要性。绝大部分的人类口腔病毒噬菌体具有溶源性作用，表明这些病毒可能有一个重要作用，就是帮助塑造人口腔的微生物多样性。唾液病毒可能作为口腔环境的病原基因功能库。

表4-2　人体病毒多样性和病毒载量

器官、系统	每毫升液体病毒样颗粒(VLPs)	每cm^2 VLPs	总VLPs	基因型数量
口/鼻/咽	2.1×10^{8}		1.2×10^{10}	250
牙齿相关	8.5×10^{7}		3.0×10^{9}	?
下呼吸道	2.8×10^{8}		1.4×10^{11}	250
远端肠道	4.8×10^{8}		3.0×10^{12}	1000
血液	1.0×10^{5}		1.0×10^{8}	20
皮肤		1.2×10^{6}	2.1×10^{10}	?
阴道	6.6×10^{7}		1.2×10^{9}	?
尿道	3.7×10^{6}		1.9×10^{9}	?
总计			3.0×10^{12}	1500

注：引自 M. Haynes and F. Rohwer. The Human Virome, Chapter 4

除了噬菌体外，口腔中仍有相当数量的真核病毒。用PCR方法检测牙周炎组织提取的DNA，测得至少有6种DNA双链疱疹病毒，如疱疹病毒1型、EB病毒1～2型、巨细胞病毒和人疱疹病毒6～8型(表4-3)。这些病毒潜伏在口腔中方便它们的播散。健康人每毫升唾液中包含3.6×10^{2}～1.6×10^{9}拷贝的EB病毒，1/2的牙周炎患者能探测到巨细胞病毒，含量在3.3×10^{3}～4.2×10^{4}拷贝/ml，而牙周正常人群唾液中不能检测到该病毒。疱疹病毒6型和7型的唾液检出率超过90%，浓度能达到几百万基因拷贝。疱疹病毒8型在唾液中含量

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

$(2.6\sim4.1)\times10^6$。单纯疱疹病毒1型是唇疱疹的主要病原体，少数患者还可因感染细胞的破坏脱落而引起口腔、牙龈、颌面部等处的黏膜成群性疱疹。引起手足口病的肠道病毒71型、柯萨奇A-16型流行广泛，主要表现为患者口腔黏膜溃疡。唾液也可能是肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒的潜伏部位。

表4-3　牙龈组织的疱疹病毒基因组检测

疱疹病毒	牙周炎组织(14例)	正常组织(11例)	P值(卡方检验)
单纯疱疹病毒1型	8(57%)	1(9%)	0.04
EB病毒1型	11(79%)	3(27%)	0.03
EB病毒2型	7(50%)	0	0.02
人巨细胞病毒	12(86%)	2(18%)	0.003
人疱疹病毒6型	3(21%)	0	0.31
人疱疹病毒7型	6(43%)	0	0.04
人疱疹病毒8型	4(29%)	0	0.17
合计	14(100%)	5(45%)	0.007

注：引自 Slots J. Human viruses in periodontitis. Periodontology, 2000, 2010, 53:89-110

四、口腔古菌组

古菌在地球上分布十分广泛，能够生存于火山口、盐湖等高热、高盐度、高低酸碱度、低氧等极端环境中。进一步研究发现，古菌也存在各种各样非极端环境中，包括人体胃肠道、阴道乃至口腔环境。目前，有3种古菌可以进行培养，分别是口腔甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter oralis*, *M. oralis*)、史氏甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter smithii*)和斯氏甲烷球形菌(*Methanosphaera stadtmanae*)，其中前两种分离自人口腔。采用亨盖特滚管技术(Hungate roll-tube technique)进行严格厌氧培养分离，培养条件是：80% H_2和20% CO_2。另外，16S rDNA分子生物学技术检测胃肠道和口腔标本，还探测有其他的古菌，包括甲烷八叠球菌属、热原体属和嗜盐古菌，但仍以甲烷短杆菌序列最为丰富，丰度在38%～96%之间。使用16S rRNA序列研究检测方法，在健康人群的龈袋中、牙周病患者的牙周袋和牙髓病患者的根尖周炎性组织中都发现了古菌。但是，迄今为止，仍然没有发现任何致病性古菌。有研究表明，产甲烷类古菌能促进牙周组织的破坏，促进牙周病的发展，不参与感染的发生。在一项调查中，16S rDNA PCR探测龈下菌斑中甲烷短杆菌阳性率37/48(77%)。进而用16S rDNA测序方法探测到36%的受试人群的牙周损害位点存在甲烷短杆菌属；同时，其相对数量与古菌活跃位点的牙周病严重程度呈正相关。

第二节　核心口腔微生物组

在复杂多样的个体微生物组成之间是否有共同的核心口腔微生物组的存在呢？如果有物质上的核心，理解微生物组的策略就相对清楚了：用16S rRNA技术鉴定组成核心的微生物，测序它们的基因组，用这些基因组作为框架研究宏基因组、宏转录组、宏蛋白组，并通过

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

与已知序列的比较，从而获得小片段的基因、转录、蛋白的信息。通过检测3名健康高加索人口腔内5个部位的微生物组，发现优势分类群是厚壁菌门（链球菌属、韦荣球菌属）、变形菌门（奈瑟菌属、嗜血杆菌属）、放线菌门（棒状杆菌属、罗斯菌属、放线菌属）、拟杆菌门（普雷沃菌属、二氧化碳噬纤维菌属、卟啉单胞菌属）、梭杆菌门（梭杆菌属）。每个单独的样品平均藏匿有266种"物种级"表型，颊部样本多样性最小，牙齿邻面样本多样性最高。3个个体的总共6315个独特序列中有1660个相同序列，这1660个相同序列即"核心微生物组"贡献了66%的测序内容。研究证实，不相关健康人口腔中大部分微生物组是相同的，提示存在健康口腔核心微生物组的概念。另有研究分析全球不同国家地区的人群口腔微生物组成，结果发现有8个属的细菌贡献了大于70%的测序序列。通过采集12个健康人的漱口液，将核心微生物按丰度高低依次排列为：链球菌属（25%）、普雷沃菌属（16%）、嗜血菌属（12%）、罗斯菌属（7%）、韦荣球菌属（6%）、奈瑟菌属（6%）、梭杆菌属（6%）、卟啉单胞菌属（4%）等。

一、链球菌属

链球菌属（*Streptococcus*）细菌是自然界中分布较广、种类较复杂的一群革兰阳性球菌，因呈链状排列得名。临床细菌学根据溶血现象将此菌属细菌分为甲型溶血性链球菌（又称α-溶血性链球菌或草绿色链球菌）、乙型溶血性链球菌（又称β-溶血性链球菌）及丙型溶血性链球菌群（又称γ-溶血或不溶血链球菌群）。

（一）链球菌属的主要生物学特性

链球菌细胞一般为球形或卵圆形，直径小于2μm，成对或链状排列，在液体培养基中容易形成长链状。该菌细胞的形态及长度在菌种和菌株间尚有差异，并受培养基种类和成分的影响。多数菌种均无荚膜形成，但一些菌种在早期生长时可形成透明质酸荚膜。肺炎链球菌则具有多糖荚膜。一些菌种在含蔗糖的培养基中可产生细胞外多糖，但不是真正的荚膜。所有菌种均不形成内生芽胞，通常无动力，革兰染色为阳性。

除厌氧链球菌群的细菌要求严格厌氧以外，大多数链球菌均为兼性厌氧菌。口腔链球菌群细菌则多数要求补充5%～10%的CO_2。最适生长温度37℃，最适pH值为7.2左右，但菌种间尚存在一定的差异。

链球菌为化能有机营养菌，发酵代谢型。链球菌对营养的要求较高，包括氨基酸、肽类、嘌呤、嘧啶、维生素、碳水化合物和无机盐类。在固体培养基上生长时需补充葡萄糖、血液或血清，有些菌种尚需提供特殊的生长因子，变异链球菌生长时需要对氨基苯甲酸。

在血琼脂表面（37℃、24小时培养）形成直径为0.5～1.0mm的菌落。大多数菌种不产生色素，仅无乳链球菌和一些肠球菌的菌株可形成黄色、橙色或砖红色菌落。不同菌种在血琼脂表面产生不同的溶血反应，如酿脓链球菌产生β溶血环，血链球菌则产生α溶血环，变异链球菌产生γ溶血环。含葡萄糖的液体培养基可明显地促进该菌属细菌生长。但值得注意的是，液体培养基中乳酸的集聚，使pH迅速下降，可抑制该菌的生长。故需在培养基中加入碱，控制其酸碱度，或使用具有高度缓冲作用的培养基。

链球菌发酵碳水化合物的主要产物是乳酸，其次为醋酸和甲酸。有的菌种可产生乙醇和CO_2。所有的菌种均可发酵葡萄糖，但对甘露醇、山梨醇、棉子糖、乳糖、麦芽糖的发酵反应以及是否水解七叶苷和从精氨酸产氨，在各菌种间则存在差异。该属细菌触酶试验为阴性，可区别

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

于其他需氧和兼性厌氧的革兰阳性球菌，如微球菌（触酶弱阳性）和葡萄球菌（触酶阳性）。

链球菌属的大多数细菌对广谱抗生素（如氨苄西林、红霉素等）敏感。近年来已发现一些对抗生素耐药的链球菌菌株，特别是对四环素的耐受株多见。这些耐受株通过突变、重组和获得 R 质粒等遗传方式产生耐药性。

链球菌属的 DNA 的 G+C 摩尔分数为 34% ~46%（Tm 法或 Bd 法）。模式种为酿脓链球菌。

（二）链球菌属的流行分布

大多数链球菌种是人或动物体内的正常菌群成员，其中口腔链球菌群是正常口腔中的优势菌群，其检出率可高达 80% 以上。这些细菌可参与宿主局部生物屏障的构成，在维持宿主的生态平衡中起着重要的作用。当然，某些菌种可能是宿主局部感染及变态反应的重要病原菌，在口腔中最常见的化脓性溶血性链球菌主要有酿脓链球菌和肺炎链球菌，偶尔亦可检出无乳链球菌。化脓性溶血性链球菌群的大多数菌株在血琼脂平皿上均可产生 β-溶血反应，仅少数菌株产生 α-溶血反应。近期的生态学研究指出，β-溶血性链球菌可能是人上呼吸道的常驻菌。而变异链球菌则被认为是重要的致龋菌。口腔中的其他链球菌亦可作为条件致病菌，参与口腔内的混合感染，如牙髓炎、冠周炎及拔牙后感染等。

对 127 例舌背样品的细菌测序分析，其中链球菌属细菌按丰度从高到低分布依次为：副血链球菌（*S. parasanguis*）、唾液链球菌（*S. salivarius*）、婴儿链球菌（*S. infantis*）、澳大利亚链球菌（*S. australis*）、前庭链球菌（*S. vestibularis*）、泛口腔链球菌（*S. peroris*）、缓症链球菌（*S. mitis*）、嗜热链球菌（*S. thermophilus*）、口腔链球菌（*S. oralis*）、戈氏链球菌（*S. gordonii*）、血链球菌（*S. sanguis*）及其他链球菌（others）（图 4-3）。

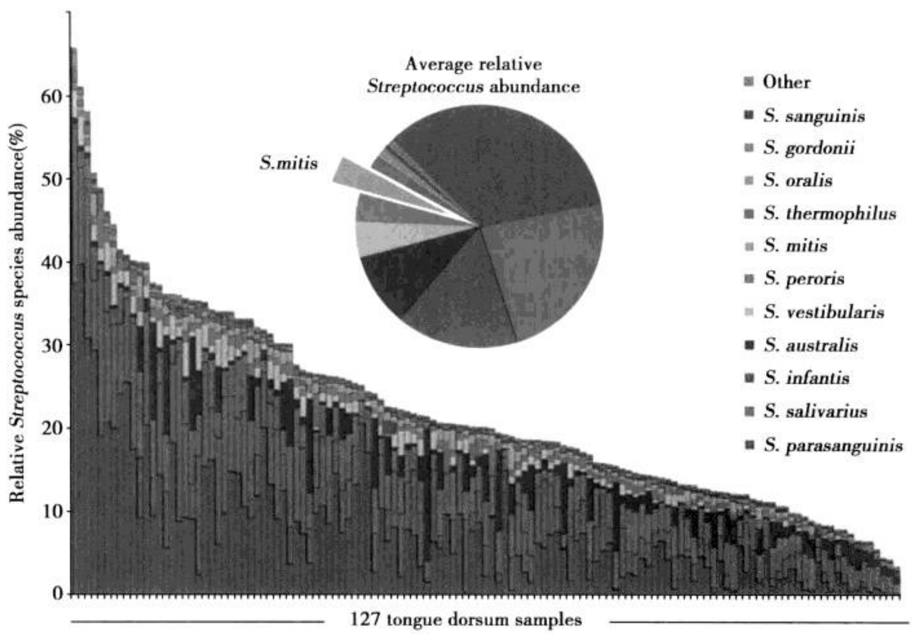


图 4-3　127 例舌背样品的链球菌丰度分布

注：此图来自文章：Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature, 2012, 486(7402): 207-214

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、普雷沃菌属

普雷沃菌属(*Prevotella*)又名普氏菌,是近年来以法国微生物学家 A. R. Prevol 的名字命名的一个菌属。该属细菌原属拟杆菌属,包括拟杆菌属中对胆盐敏感的菌种和解糖的产黑色素菌种。

普雷沃菌是人龈沟的优势菌,也是牙周炎的可疑病原菌。在口腔中报道的主要菌种分为两大类:一是产黑色素的普雷沃菌,包括中间普雷沃菌(*P. intermidius*)、产黑色素普雷沃菌(*P. melaninogenica*)、洛氏普雷沃菌(*P. loescheii*)、变黑普雷沃菌(*P. nigrescens*)、栖牙普雷沃菌(*P. dentocola*)和人体普雷沃菌(*P. corporis*)等;二是不产黑色素的普雷沃菌,包括口腔普雷沃菌(*P. oralis*)、口普雷沃菌(*P. oris*)、龈炎普雷沃菌(*P. oulorum*)、口颊普雷沃菌(*P. buccalis*)、真口腔普雷沃菌(*P. verolo*)、动胶普雷沃菌(*P. zoogleofrmans*)、两路普雷沃菌(*P. bivia*)和解糖胨普雷沃菌(*P. disiens*)等。最近又分离了产生色素不定的栖组织普雷沃菌(*P. histicola*)。

(一) 普雷沃菌属主要生物学特性

普雷沃菌属细菌为专性厌氧菌,革兰阴性,细胞以短杆状多见,偶见长杆状,无芽胞、无动力。大多数菌种生长要求补充氯化血红素和维生素 K。在血琼脂平板表面,产生黑色素的普雷沃菌形成黑色菌落。在 PYG 液体培养基中产生的醋酸、琥珀酸为主要终末酸产物。发酵葡萄糖、水解明胶,对胆盐敏感可区别于耐受胆盐的拟杆菌属细菌。

(二) 普雷沃菌属的流行分布

普雷沃菌属细菌在健康人群唾液中的丰度分布从高到低依次为:产黑色素普雷沃菌、坦纳普雷沃菌、中间普雷沃菌、栖组织普雷沃菌、变黑普雷沃菌等等。

三、嗜血菌属

嗜血菌属(*Hemophilus*)又名嗜血杆菌,是一群革兰阴性的兼性厌氧杆菌,因生长要求血液而得名。该菌属属于马斯特菌科,大多数细菌是人和动物口腔及鼻咽部的正常菌群成分之一。嗜血菌在口腔的主要定植部位是牙菌斑,其次是唾液、软腭等。嗜血菌属在口腔中常见的菌种有嗜沫嗜血菌(*H. aphrophilus*)、副嗜沫嗜血菌(*H. paraphrophilus*)、副溶血嗜血菌(*H. parahaemolyticus*)、溶血类嗜沫嗜血菌(*H. praaprohaemolyticus*)和惰性嗜血菌(*H. segnis*),流感嗜血菌(*H. influenzae*)、副流感嗜血菌(*H. parainfluenzae*)和溶血嗜血菌也偶尔从口腔中检出。

(一) 嗜血菌属主要生物学特性

嗜血菌属细菌细胞一般为宽度小于 1μm、长度不一的细小至中等大小的球杆状或杆状,有时可见细丝状体细胞,呈明显的多形态。该属细菌无芽胞、无荚膜、无动力,革兰染色阴性。

嗜血菌属细菌为需氧或兼性厌氧菌,最适宜的生长大气环境为补充有 5% ~10% CO_2 的大气条件,最适宜的生长温度为 35 ~37℃。其生长还要求提供存在于血液中的生长因子,特别是 X 因子或 V 因子,巧克力血琼脂是其生长的常用培养基。嗜血菌属为化能有机营养菌。在 37℃、48 小时的血琼脂表面,大多数菌种形成直径 0.5 ~2.0mm、扁平或凸起、无色或浅黄色的光滑菌落,少数菌种(如副流感嗜血菌)产生粗糙型菌落。溶血嗜血菌、副溶血嗜血菌和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

溶血类嗜沫嗜血菌可产生 β-溶血反应。多数菌种的肉汤培养物均呈混浊状，而嗜沫嗜血菌、副嗜沫嗜血菌则呈有明显沉淀的颗粒状。在含葡萄糖的肉汤中，嗜血菌属细菌产生的终末代谢酸产物为醋酸、乳酸和琥珀酸。

嗜血菌属细菌可还原硝酸盐为亚硝酸盐，但氧化酶和触酶的产生不定。其发酵碳水化合物的能力有利于菌种之间的鉴别。

DNA 的 G+C 摩尔分数为 37% ~44%（Tm 法）。模式株是流感嗜血菌。

（二）嗜血菌属的流行分布

口腔中常见的嗜血菌种大多数是人口腔和上呼吸道黏膜的正常菌群成员，一般不致病，但可作为条件致病菌参与口腔的混合感染，如牙周脓肿、下颌感染等。

流感嗜血菌在健康儿童的鼻咽部的检出率可高达 75%，但成人的带菌率很低，产生荚膜的菌株在健康鼻咽部的检出率仅为 3% ~7%。该菌在人口腔中的检出率极低。

四、罗斯菌属

罗斯菌属（*Rothia*）原仅有一个菌种，即龋齿罗斯菌（*R. dentocariose*），但近期原名黏滑口腔球菌（*Stomatococcus mucilaginosus*）的菌种被分类于罗斯菌属中，命名为黏滑罗斯菌（*Rothia mucilaginosus*）。

（一）罗斯菌属主要生物学特性

革兰阳性无芽胞的兼性厌氧杆菌。球形、类白喉棒杆菌形态或丝状体，但多以混合形式存在。细胞直径一般为 1.0μm，不规则的、膨大的棒状末端直径可达 5.0μm。固体培养基上的培养物多为丝状体，而肉汤培养物则以球形多见。孵育 2 ~3 天的陈旧肉汤培养物可能完全为球菌，但此球菌形态易改变。本菌无芽胞、无荚膜、无动力、不耐酸，革兰染色为阳性。

细胞壁肽聚糖包括丙氨酸、谷氨酸和赖氨酸。主要的细胞壁糖类是半乳糖和少量的葡萄糖、果糖、核糖，无 6-脱氧塔罗糖和阿拉伯糖。细胞外膜的主要脂质成分是三酰甘油。

兼性厌氧菌，在有氧环境下生长良好，部分菌株的初代培养要求在厌氧条件下（80% 的 N_2、10% 的 H_2 及 10% 的 CO_2）孵育。适宜的生长温度是 35 ~37℃。6% 的 NaCl 和 0.05% 的结晶紫可抑制该菌生长，但其在 10% 胆汁及 0.01% 亚碲酸钾的培养基中可生长。

化能有机营养菌，发酵代谢型。在厌氧条件下生长 18 ~24 小时的幼龄菌落常为丝状微菌落，亦可见蜘蛛状菌落。在有氧条件下生长的幼龄菌直径约 1mm。菌落表面光滑或呈颗粒状，常常可见伞状边缘。孵育 4 ~7 天的成熟菌落为直径 2 ~6mm，乳白色、有光泽、光滑型或粗糙型菌落。少数干燥菌落呈明显的盘卷状。在同一琼脂平板中可同时存在光滑型和粗糙型菌落，亦可出现疏松、易碎或黏性的菌落。龋齿罗斯菌在 PYG 肉汤中主要的酸产物是乳酸，不产生丙酸。

可发酵葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、果糖和水杨素产酸，但不发酵木糖、阿东糖醇、苦杏仁苷、纤维二糖、卫矛醇、糖原、菊粉、肌醇、甘露醇、山梨醇和淀粉，对乳糖、阿拉伯糖、糊精、半乳糖、甘露糖、松三糖、鼠李糖和核糖的发酵反应不定。该菌触酶试验阳性，不产生吲哚，可还原硝酸盐和亚硝酸盐，水解七叶苷、淀粉和酪蛋白，水解明胶不定。脲酶试验为阴性，该菌在三糖铁琼脂上可产生 H_2S。

龋齿罗斯菌的 API 酶试验结果：亮氨酸氨肽酶、胰蛋白酶、α-葡萄糖苷酶为阳性，碱性磷

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

酸酶、脂酶、磷酰胺酶、α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、α-甘露糖苷酶、β-木糖苷酶均为阴性反应。脂酶、缬氨酸氨肽酶、酸性磷酸酶、N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶的反应不定。

龋齿罗斯菌对大多数抗生素类药物敏感，最低抑菌浓度为0.06～0.26mg/L的抗生素类药物有头孢噻吩、头孢噻啶、红霉素、氨苄西林、金霉素、青霉素和羧苄西林。该菌对克林霉素耐药，对林可霉素高度耐药。偶见多重耐药菌株。

DNA的G+C摩尔分数为47%～57%（Tm法）。模式株为ATCC17931。

（二）罗斯菌属的流行分布

龋齿罗斯菌可从人的口腔中检出，主要定植于唾液和龈上菌斑，是人口腔的正常菌群成员，与口腔感染性疾病的关系尚未证实。作为条件致病菌已从心内膜炎和其他临床感染标本中检出。

五、韦荣菌属

韦荣菌属（*Veillonella*）细菌为革兰阴性厌氧球菌，属韦荣菌科。其中小韦荣菌、非典型韦荣菌和殊异韦荣菌可分离自人的口腔和上呼吸道。口腔中常见的菌种是小韦荣菌（*V. parvula*），其次是非典型韦荣菌（*V. atypic*）和殊异韦荣菌（*V. dispar*）。

（一）韦荣菌属主要生物学特征

韦荣菌细胞为球形，直径0.3～0.5μm，成对、团块状或短链状排列，不形成芽胞，无动力，革兰染色阴性。

韦荣菌为专性厌氧菌，生长要求补充CO_2。最适生长温度为30～37℃，在40℃条件下生长差，在18℃和45℃条件下均不生长。最适pH值为6.5～8.0。韦荣菌为化能有机营养菌，其生长对营养的要求较复杂。大多数菌种要求氨基酸、维生素B_1和B_6、生物素、对氨基苯甲酸、丙酮酸盐及其他生长因子，部分菌种要求腐胺和尸胺。

韦荣菌一般不发酵碳水化合物和多元醇类，氧化酶和触酶试验均为阴性，但少数菌种可通过一种假触酶分解H_2O_2；不产生吲哚，亦不液化明胶，可还原硝酸盐成亚硝酸盐；可发酵丙酮酸盐、乳酸盐、苹果酸、富马酸和草酰乙酸，从乳酸盐产生醋酸、丙酸、CO_2和H_2。

DNA的G+C摩尔分数为36%～43%（Tm法）或40%～44%（Bd法）。模式种为小韦荣菌。

（二）小韦荣菌

小韦荣菌为革兰阴性小球菌，常成堆或成团块排列。小韦荣菌是口腔中最常见的革兰阴性厌氧球菌，可从唾液、舌面、牙菌斑等标本中检出。小韦荣菌可利用变异链球菌产生的乳酸，而被认为是牙菌斑中的有益菌，也是人肠道的正常菌群成员之一。

六、奈瑟菌属

奈瑟菌属（*Neisseria*）细菌是一种需氧的革兰阴性双球菌，属于奈瑟菌科。口腔、鼻咽部是其主要的定植部位。除脑膜炎奈瑟菌（*N. meningitidis*）和淋病奈瑟菌（*N. gonorrhoeae*）是人重要的病原菌外，大多数奈瑟菌都是人体内正常菌群成员，一般无致病性。

口腔中常见的奈瑟菌是干燥奈瑟菌（*N. sicca*），其次是微黄奈瑟菌（*N. subflava*）、乳糖奈瑟菌（*N. lacatmica*）、灰色奈瑟菌（*N. cinerea*）和长奈瑟菌（*N. elongata*）。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（一）奈瑟菌属主要生物学特征

奈瑟菌为需氧菌，营养要求不高，在普通琼脂培养基上均可生长。大多数奈瑟菌细胞为球形，偶有短杆状，直径 0.6～1.0μm，多成对排列，相邻面呈扁平状，可有荚膜和菌毛，无内生芽胞和鞭毛。

除长奈瑟菌，其他奈瑟菌的氧化酶和触酶试验均为阳性反应。该菌属大多数菌种不还原亚硝酸盐，但犬奈瑟菌可还原硝酸盐成亚硝酸盐。

（二）干燥奈瑟菌

干燥奈瑟菌是口腔最常见的奈瑟菌种，亦是口腔中的正常菌群成员之一，可分离自人的唾液、牙石和菌斑。此外，该菌还可从人的鼻咽部和痰液中检出。

七、梭杆菌属

梭杆菌属（*Fusobacterium*）细菌是一群革兰阴性无芽胞的专性厌氧杆菌，属拟杆菌科。在口腔中发现的梭杆菌属细菌主要有具核梭杆菌（*F. nucleatum*）、牙周梭杆菌（*F. periodenticum*）、龈沟梭杆菌（*F. alocis*）、沟迹梭杆菌（*F. sulci*）、可变梭杆菌（*F. varium*）、坏死梭杆菌（*F. necrophorum*）等，死亡梭杆菌（*F. mortiferum*）、舟形梭杆菌（*F. naviforme*）、拉氏梭杆菌（*F. russii*）也偶尔从口腔中检出。

（一）梭杆菌属主要生物学特性

梭杆菌属细菌大多为梭状细胞，但也可呈多形态细胞。如多形梭杆菌可呈多形态的球状或杆状细胞，而死亡梭杆菌则可呈明显多形态、不规则的球形肿胀细胞和线性细胞。该菌无动力、无芽胞，革兰染色为阴性。

梭杆菌属细菌为专性厌氧菌，能在有氧培养和补充 5%～10% CO_2 空气的琼脂平板表面生长。但对氧的敏感性与菌种、接种量和培养基的种类有关。氧化培养基可抑制某些菌种的生长。在这些培养基中，加入 5%～10% 的血清或腹水可维持细菌生长。该属细菌最适生长温度是 37℃，最适 pH7.0 左右。在含蛋白胨和酵母提出物的复杂营养培养基中可生长，瘤胃液、氯化血红素和挥发性脂肪酸可刺激该菌生长。

梭杆菌属细菌是人和动物体内的正常菌群成员，部分菌种可条件致病，可从临床的脓液、坏疽性感染标本中检出。在口腔中最常见的梭杆菌属细菌是具核梭杆菌，它可在唾液和菌斑中检出，被认为是牙周炎、根管感染和拔牙后感染的混合感染性细菌之一。坏死梭杆菌、舟形梭杆菌、可变梭杆菌、死亡梭杆菌和拉氏梭杆菌也可从口腔中检出，但检出率较低。除坏死梭杆菌外，其余均未见与口腔疾病有关的文献报道。牙周梭杆菌、龈沟梭杆菌和沟迹梭杆菌是近年从不同类型牙周炎患者的龈下菌斑标本中分离的 3 个新菌种。这些新菌种在龈下菌斑中有较高的检出率，与牙龈炎和牙周炎有密切关系。

DNA 的 G+C 摩尔分数为 26%～34%。模式种是具核梭杆菌。

（二）具核梭杆菌

具核梭杆菌常作为积聚桥，在口腔细菌牙面定植和相互聚集中起重要作用（图 4-4）。

具核梭杆菌主要分离自口腔的龈缘和龈沟，是口腔正常菌群成员，也可从上呼吸道和胸腔感染灶中分离到，偶尔从伤口和其他类型的感染灶中检出。有关该菌与牙周炎和根管感染细菌病因学关系的讨论表明，具核梭杆菌作为口腔感染性疾病的条件致病菌是可以肯定的，特别是在破坏性牙周炎和牙髓感染样本中有较高的检出率。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

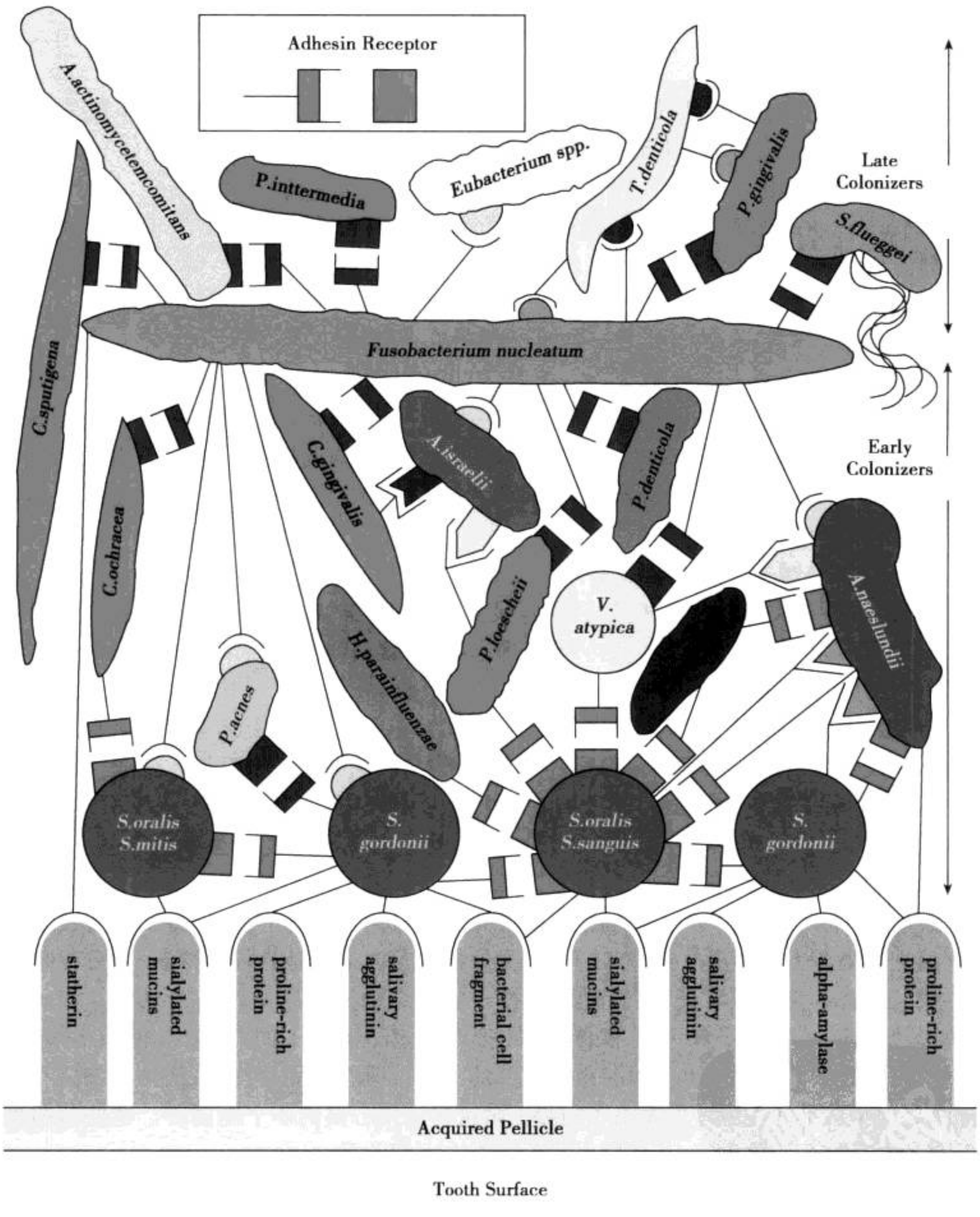


图 4-4 口腔细菌定植模式图

注：具核梭杆菌起凝集桥作用。来自文章：Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, et al. Communication among Oral Bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 2002, 66(3): 486-505

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

八、卟啉单胞菌属

研究发现，不解糖拟杆菌、牙龈拟杆菌和牙髓拟杆菌是一群在生物学性状上与拟杆菌属其他菌种有显著差异，但又具相关同源性的菌种。《国际细菌学分类杂表》(1998)将这3种拟杆菌命名为新菌属——卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)，将与其相关的菌种更名为不解糖卟啉单胞菌(*P. asaccharolytica*)、牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)和牙髓卟啉单胞菌(*P. endodentalis*)，牙周卟啉单胞菌(*P. circumdentaria*)、唾液卟啉单胞菌(*P. salivosa*)和利氏卟啉单胞菌(*P. levii*)是近年命名的种或联合种。

(一) 卟啉单胞菌属主要生物学特性

卟啉单胞菌属的肉汤培养细胞一般为(0.5～0.8)μm×(1.0～3.5)μm大小的较小杆状或球杆状，偶尔有4～6μm的长细胞。该属细菌无芽胞、无动力，革兰染色阴性。

卟啉单胞菌属细菌为专性厌氧菌，最适生长温度为37℃。在血琼脂平板上可形成直径1～3mm、凸起、有光泽、表面光滑(很少粗糙型)的菌落，孵育6～10天后，可见从菌落边缘向中心发展的暗黑色色素。由于氯化血红素的产生，使整个菌落变黑。

碳水化合物对卟啉单胞菌属细菌的生长无明显影响，而氮源基质如蛋白胨、胰蛋白酶水解物和酵母提出物，则可明显地促进其生长。在PYG培养基中产生的主要终末酸产物是丁酸和醋酸，也可有少量的丙酸、异丁酸和异戊酸。

卟啉单胞菌属细菌的细胞壁肽聚糖含赖氨酸，主要的呼吸醌类是具有9或10个异戊二烯单位的不饱和甲基萘醌类，并含有非水解的和3-水解的长链脂肪酸。不发酵碳水化合物产酸，苹果酸脱氢酶(MDH)和谷氨酸脱氢酶阳性，无葡萄糖磷酸脱氢酶和6-磷酸葡萄糖酸盐脱氢酶，可产生吲哚，不还原硝酸盐成亚硝酸盐，不水解淀粉和七叶苷。

DNA的G+C摩尔分数是46%～54%。模式种是不解糖卟啉单胞菌。

(二) 牙龈卟啉单胞菌

牙龈卟啉单胞菌菌细胞为0.5μm×(1～2)μm大小的杆状或球杆状，固体培养基上的细胞为球杆状或很短的杆状。

在血琼脂平板表面形成直径1～2mm、凸起、有光泽、表面光滑(偶尔粗糙)的黑色菌落，培养4～8天后可见从菌落边缘向中心扩散的黑色素；有极少数的菌落不产生黑色素。血红素是主要的卟啉产物，但也可见痕迹量的原卟啉。在BM或PYG培养基中产生的主要终末酸产物是丁酸和醋酸，亦有少量的丙酸、异丁酸、异戊酸和苯乙酸。该菌可产生吲哚，不产生α-墨色藻酶，不还原硝酸盐成亚硝酸盐，不水解七叶苷和淀粉。MDH和谷氨酸脱氢酶阳性，葡萄糖磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸盐脱氢酶阴性和产生醋酸是区别于其他卟啉单胞菌的重要鉴别特性。

九、放线菌属

放线菌属(*Actinomyces*)是一群革兰阳性不规则的杆菌。早期，放线菌属被列入真菌或被称为“其他微生物”。近期的大量研究证明，放线菌具有一般细菌的特性。《伯杰系统细菌学手册》将放线菌属列入革兰阳性无芽胞的不规则杆菌部分。口腔中常见的放线菌有衣氏放线菌(*A. iseralii*)、内氏放线菌(*A. naeslundii*)、龋齿放线菌(*A. odontolyticus*)、黏性放线菌(*A. viscosus*)、齿垢放线菌(*A. denticolens*)以及酿脓放线菌(*A. pyogenes*)、迈氏放线菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(*A. meyeri*)、乔氏放线菌(*A. georgiae*)、戈氏放线菌(*A. gerenoseriae*)。

(一) 放线菌属主要生物学特征

放线菌属细胞的形状和大小变化较大,常为直或稍弯的杆菌,直径0.2~1.0μm,长5.0~10μm;亦可见明显分支的细丝状体,长1.5~5.0μm,末端可呈棒状,偶见球杆状细胞;排列不规则、单个、成对、链状、簇状、栅栏状或Y、V、T字形;无动力、无芽胞,亦不产生分生孢子。

放线菌细胞壁的肽聚糖包括赖氨酸、丙氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸和鸟氨酸,但各菌种之间尚有差异。如内氏放线菌细胞壁不含赖氨酸,而酿脓放线菌则有赖氨酸、丙氨酸和D-谷氨酸。所有放线菌的细胞壁均不含二氨基庚二酸(DAP)和甘氨酸。其细胞壁的糖类包括葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、6-脱氧塔罗糖、墨角藻糖和甘露糖,无阿拉伯糖和木糖。

放线菌属各菌种对氧的敏感程度存在差异,但初代培养均要求在厌氧环境中生长。最适生长温度为35~37℃,部分菌种在30℃和45℃环境中亦能生长。最适pH值为6.7~7.0。

放线菌属为化能异养菌,发酵代谢型。生长要求有机氮源,血清可明显地促进其生长,但对其他营养的要求不同菌种各异。在孵育18~24小时后的琼脂表面可形成具有分支菌丝体或蜘蛛状的微菌落,这种典型的蛛网型菌落常有助于鉴别。孵育7~14天后的成熟菌落很少有交织的丝状体,在BHI琼脂表面形成直径0.5~5.0mm、臼齿状、干燥易脆、表面粗糙的菌落,多为乳白色,偶有深红色和粉红色。放线菌的液体培养物为散在的、大小不等的致密团块,可见颗粒或絮状沉淀。

所有放线菌种均发酵葡萄糖、果糖产酸,但不产气。棉子糖、木糖、纤维二糖、苦杏仁苷、核糖、水杨素的发酵类型以及触酶的产生,硝酸盐和亚硝酸盐还原试验,是否水解尿素或明胶,有助于菌种之间的鉴别。放线菌对青霉素、氨苄西林和利福平高度敏感,对氯霉素、红霉素等中到高度敏感,对黏菌素、甲硝唑及抗真菌药物和抗结核药物有耐药性。

DNA的G+C摩尔分数为57%~69%(Tm法)。模式种为牛型放线菌(*A. bovis*)。

(二) 放线菌属的流行分布

放线菌作为口腔正常菌群的成员,特别是牙菌斑生物膜的优势菌已被广泛认可。衣氏放线菌、内氏放线菌、黏性放线菌和龋齿放线菌,可从人的牙菌斑、牙石和唾液中检出,迈氏放线菌主要定植在龈沟内。临床和流行病学的调查表明,衣氏放线菌可引起面颈部、肺部和腹部的放线菌病以及结膜炎、泪管炎等疾患;内氏放线菌和迈氏放线菌常常从龈炎、牙周炎、牙髓根尖周感染和冠周炎的临床材料中检出;黏性放线菌被认为是致龋菌。

十、棒状杆菌属

棒状杆菌属(*Corynebacterium*)细菌在口腔分布的主要是白喉棒状杆菌(*C. diphtheriae*)、马氏棒状杆菌(*C. matruchotii*)、坚硬棒状杆菌(*Corynebacterium durum*)、产黏棒状杆菌(*Corynebacterium mucifaciens*)、解脲棒状杆菌(*C. urealyticum*)等。其中,白喉棒状杆菌(*C. diphtheriae*)致病性强,可引起白喉(diphtheria)。其余细菌一般无致病性,多为条件致病菌。

棒状杆菌为革兰染色阳性杆菌,菌体粗细不一,常一端或两端膨大呈棒状,故名。排列不规则,呈栅栏状,无荚膜,无鞭毛,无芽胞。用亚甲蓝染色后,菌体两端或一端可见着色较

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

深的异染颗粒。需氧或兼性厌氧。生长适宜温度为34～37℃，适宜的pH为7.0～7.6。细菌在含有凝固血清的吕氏培养基（Leffler medium）上生长迅速，12～18小时即形成细小、灰白色、湿润、圆形突起的菌落。在含有0.03%～0.04%亚碲酸钾（$K_2TeO_2 \cdot 3H_2O$）血琼脂平板上生长时，能使其还原为元素碲，故菌落呈黑色。

十一、二氧化碳噬纤维菌属

二氧化碳噬纤维菌属（*Capnocytophaga*）细菌系革兰阴性兼性厌氧杆菌，是从人口腔龈下菌斑中分离并命名的一个菌属。《伯杰系统细菌学手册》第3卷（1988）将该菌属列入"无光合性、无子实体的滑动细菌"中，属噬纤维菌科。在口腔中发现并命名的二氧化碳噬纤维菌菌种有：黄褐二氧化碳噬纤维菌（*C. ochracer*）、生痰二氧化碳噬纤维菌（*C. sputigena*）、牙龈二氧化碳噬纤维菌（*C. gingivalis*）、颗粒二氧化碳噬纤维菌（*C. granulosa*）和溶血二氧化碳噬纤维菌（*C. heamolytica*）。

（一）二氧化碳噬纤维菌属主要生物学特性

二氧化碳噬纤维菌细胞为（0.42～0.6）μm×（2.5～2.7）μm大小、长短不一的曲绕杆状或丝状，末端通常圆或略尖。其液体培养细胞呈多形态或长丝状体，并可见紧密的团块。该属细菌无荚膜和鞘形成，休眠期不清楚，不形成芽胞，无鞭毛，具滑动动力，革兰染色为阴性。

二氧化碳噬纤维菌虽然被列为兼性厌氧菌，但在补充CO_2的厌氧环境中生长良好，初代培养物则必须在补充CO_2的厌氧环境中生长。次代培养物在补充5% CO_2的空气中可生长，但在有氧培养时不生长，适当的生长温度为35～37℃。

二氧化碳噬纤维菌属细菌为有机化能营养、发酵代谢型，可利用各种碳水化合物作为发酵基质和能源。发酵葡萄糖的主要终末酸产物是醋酸和琥珀酸以及痕量的异戊酸。

在TS和BHI血琼脂表面，本属细菌常常形成薄而扁平的润湿性菌落，呈扩散生长，其边缘参差不齐，通过斜射光线可清楚看见似手指的投影像边沿。在35～37℃，孵育24小时的菌落如针尖大小；孵育48～96小时的菌落直径为2～4mm、凸起，有的菌落可凹入琼脂。除溶血二氧化碳噬纤维菌外（产生β-溶血反应），其他菌种在血琼脂上不产生溶血反应。虽然该属细菌生长和滑动动力均不要求血液，但培养基的琼脂浓度可能影响细胞的扩散或滑动动力。TS血琼脂一般不可能恒定地维持这种典型的扩散或滑动动力。其培养物可产生一种特殊的气味，似焦糖味或苦杏仁味。

二氧化碳噬纤维菌属细菌在琼脂表面的菌落，可产生灰白色到粉红色及橙黄色色素，细胞离心沉淀物呈黄色到橘红色。

二氧化碳噬纤维菌不产生吲哚，可发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖和蔗糖产酸，不发酵甘露醇和木糖，水解七叶苷，触酶和氧化酶试验为阴性，ONPG和联苯胺试验为阳性。是否还原硝酸盐，水解葡聚糖、淀粉和明胶等生化试验有助于该属菌种的鉴别。

二氧化碳噬纤维菌属细菌的血清学分型至今尚不清楚。已有的研究证实，本属细菌的群特异性抗原是一种对胰蛋白酶和十二烷基硫酸钠敏感、不耐热、以蛋白质成分为主的物质（亲和层析法）。部分菌株所具有的型特异性抗原基本上由碳水化合物构成，并耐受胰蛋白酶和十二烷基硫酸钠，且耐热。

二氧化碳噬纤维菌所有菌株对青霉素、氨苄西林、红霉素、克林霉素和四环素敏感。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）二氧化碳噬纤维菌属的流行分布

二氧化碳噬纤维菌是人和灵长类动物体内的正常菌群成员，主要定植在口腔，是口腔常见的细菌，可从口腔的各部位如牙菌斑、龈沟、唾液以及痰液和咽喉标本中检出。该属细菌常常从口腔的混合菌感染灶中检出，如青少年牙周炎、感染根管、拔牙创干槽、口腔黏膜溃疡等临床标本，亦可从菌血症、软组织感染、各种损伤部位及脓肿、脑脊液、阴道、颈部、羊水、气管和眼中分离到。

第三节　口腔微生物种群的生态链

一、口腔细菌种群间的生态链

口腔微生物群的组成极其复杂，龈上菌斑以革兰阳性菌为优势菌，包括血链球菌、变异链球菌、缓症链球菌、唾液链球菌和乳杆菌，而龈下菌斑则主要由革兰阴性厌氧菌构成，如放线杆菌、伴放线凝集杆菌、福赛斯坦纳菌、弯曲杆菌、二氧化碳噬纤维菌、啮蚀艾肯菌、具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌以及口腔螺旋体如齿垢密螺旋体。不是由单一一种细菌的行为决定整个复杂群落的行为，而是由口腔微生物群的相互作用来决定。在形成生物膜结构、执行生理功能和导致微生物致病的过程中，群落成员间应具有广泛的相互作用。这些相互作用包括营养竞争、生存的协同作用、拮抗作用、毒力因子的中和作用、生长依靠信号机制干扰等。由于生长空间和营养的限制，生物膜的不同细菌间存在竞争或协同效应（图 4-5）。以变异链球菌为例，它被认为是致龋菌之一，变异链球菌对戈氏链球菌、化脓链球菌、缓症链球菌（ATCC903）、肺炎链球菌、血链球菌的抑制生长的作用是显著的；对口腔链球菌、缓

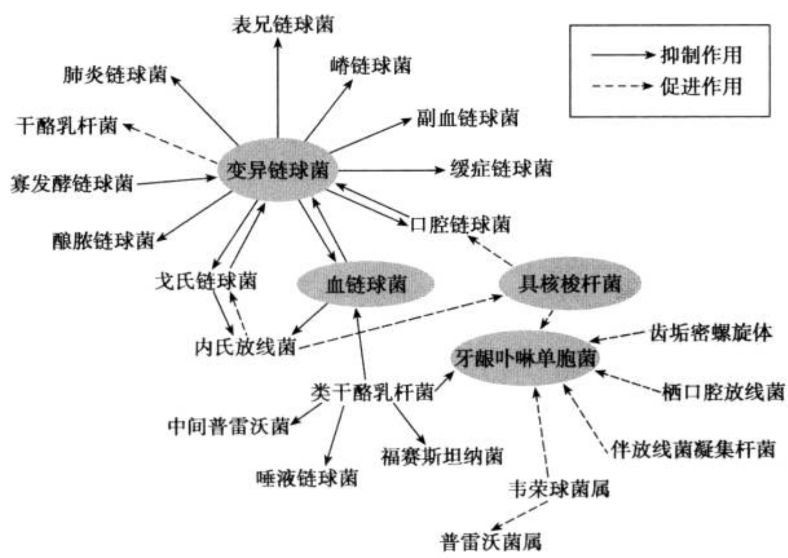


图 4-5　口腔细菌相互作用

注：实线显示抑制效应，虚线显示促进效应。来自文章：Huang R，Li M，Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence，2011，2（5）：435-444

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

症链球菌(ATCC33399)的抑制作用中等;而对表兄链球菌的作用是温和的。

一系列的双菌种实验显示,牙龈卟啉单胞菌能与戈氏链球菌、口腔放线菌、韦荣菌属、具核梭杆菌一起生长,但不能与口腔链球菌一起生长。但牙龈卟啉单胞菌在与戈氏链球菌、口腔链球菌形成3菌种生物膜时,牙龈卟啉单胞菌生长却良好,戈氏链球菌显示能促进牙龈卟啉单胞菌生长。

韦荣菌可以产生维生素K,利于普雷沃菌属和卟啉单胞菌属的生长。

动物实验也发现2种或2种以上口腔细菌的协同作用可增强毒力。在小鼠脓肿模型中,牙龈卟啉单胞菌和福赛斯坦纳菌的多重感染可导致比单菌种感染更大的病损以及更高的死亡率。

牙齿和牙龈组织上的微生物群落可在局限环境中积聚高浓度的细菌代谢产物(如脂肪酸代谢终产物、氨、过氧化氢、氧化物和二氧化碳),既会影响宿主,也会影响口腔微生物群中的细菌种群。

(一) 产酸菌与耗酸菌

具有较高比例的变异链球菌菌斑往往抑制血链球菌的水平。变异链球菌可将蔗糖代谢为乳酸,这是细菌代谢酸中酸性最强的一种。相对于血链球菌,变异链球菌具有更强的耐酸性,乳酸更有利于变异链球菌的生存。血链球菌则可以代谢产生过氧化氢,这是一种非特异性抗菌剂,对包括变异链球菌在内的其他共生菌具有拮抗作用,因为它们没有能有效代谢这种有毒物质的系统。因此,血链球菌水平相对较高的菌斑,变异链球菌水平及牙周炎相关菌(如牙龈卟啉单胞菌)水平则较低。而且,牙菌斑生物膜中血链球菌的存在与牙周致病菌低水平相关,有助于口腔健康。

牙菌斑生物膜中能够中和变异链球菌酸性代谢产物的细菌可以通过代谢乳酸或产生碱来减低生物膜的致龋性,后者包括产生氨以及一些菌斑微生物的尿素酶表达。由于唾液中存在显著比例的尿素,尿素酶可以将其转化为氨。

变异链球菌产生的乳酸可以被韦荣菌稳定代谢。韦荣菌存在于菌斑形成的早期。小韦荣菌是韦荣菌的一种,它可以将酸性较强的乳酸转化为酸性较弱的醋酸和丙酸。最近有研究发现,寡发酵链球菌亦可代谢变异链球菌产生的乳酸。寡发酵链球菌最初从无龋人体口腔中分离,其在菌斑中的数量增加与变异链球菌数量呈负相关。这种非致龋链球菌还能抑制变异链球菌的生长。这种抑制作用的机制非常独特。寡发酵链球菌通过乳酸酶的作用将变异链球菌产生的乳酸(这种在通常情况下是生长抑制剂的物质)转化为过氧化氢,过氧化氢则对变异链球菌具有高度毒性。

具核梭杆菌和中间普雷沃菌可以产生有机酸和氨,使菌斑环境接近中性,使pH值即使在产乳酸细菌和可发酵糖类存在的情况下也不至于剧烈下降,可保护酸敏感细菌(如牙龈卟啉单胞菌)免予酸攻击。

(二) 需氧菌与厌氧菌

氧代谢和交流在生物膜内不同的好氧和厌氧物种之间对于专性厌氧菌的生存具有特殊的意义。有氧物种消耗环境中的氧气,导致低水平氧浓度和产生局部氧化还原电位,提供局部厌氧条件,局部厌氧环境是专性厌氧菌生存的基础。具核梭杆菌是一个重要的桥梁菌,可使需氧和厌氧物种生活在一起。没有该菌,一些专性厌氧生物在口腔将大幅减少。

微生物代谢中产生的氧气、二氧化碳等气体可以影响生物膜细菌相互作用。许多厌氧

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

菌，包括与人体牙周病相关的细菌，也对氧化物敏感。虽然具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌都是厌氧菌，但其对氧气的耐受能力差别很大。牙龈卟啉单胞菌对氧气非常敏感，但具核梭杆菌可以耐受20%的氧气含量。具核梭杆菌还可以形成其生存所必需的嗜二氧化碳微环境。当在恒化培养基中与具核梭杆菌一起培养时，牙龈卟啉单胞菌甚至能在含20%氧气的气体环境中进行生长。这很可能是由于具核梭杆菌活跃的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide-reduced，NADH）氧化酶或过氧化物酶的作用，使其能够代谢氧分子和过氧化氢，为牙龈卟啉单胞菌形成了理想的厌氧环境。同时，具核梭杆菌还能为牙龈卟啉单胞菌提供生长所需的二氧化碳。

在有氧的条件下（5% CO_2），先接种的戈氏链球菌表现出对变异链球菌的抑制；相反，在厌氧的条件下（5% CO_2，5% H_2，90% N_2），前者对后者不产生抑制效应。而如果先接种变异链球菌，无论在有氧或厌氧条件下，都能抑制戈氏链球菌的生长。

（三）革兰阴性菌与革兰阳性菌

具核梭杆菌和其他革兰阴性细菌的共凝集是被凝集素-碳水化合物受体的相互作用所操控。例如，牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌的共凝集受牙龈卟啉单胞菌的半乳糖苷基序和具核梭杆菌凝集素调节，这种共凝集作用可以被乳糖抑制。牙龈卟啉单胞菌荚膜多糖和脂多糖参与通过受体介导的口腔细菌的共凝集。

具核梭杆菌和革兰阳性细菌之间也有共凝集效应，而这种共凝集作用很难被糖抑制。因此，具核梭杆菌和革兰阴性菌之间的共凝集作用显著不同于与革兰阳性细菌之间的作用。

二、细菌与真菌种群的生态链

真菌也在口腔中定植，尤以假丝酵母菌居多。它也是人胃肠道、呼吸道及阴道黏膜的常见共生菌，仅能在特定的条件下对宿主造成感染，故称条件致病菌。在假丝酵母菌中，白假丝酵母菌最常见、毒力最强。它在成人健康口腔的检出率可达30%～35%，主要定植部位是口腔黏膜（颊黏膜、硬腭等）、唾液、口腔矫治器及托牙基托等。白假丝酵母菌在口腔可引起急性或慢性口腔假丝酵母菌病，如假膜性假丝酵母菌病（俗称雪口）、义齿性口炎、假丝酵母菌性白斑。

真菌单独感染可引起口腔疾病。真菌-细菌的混合感染也引起多种口腔疾病，包括黏膜感染、牙周炎、根管感染和根龋等。口腔假丝酵母菌-细菌相互作用可能同多菌种的定植、感染、毒力等具有临床关联。其中，白假丝酵母菌同口腔链球菌、放线菌、梭杆菌等口腔细菌具有相互作用。但在根龋感染中，通过对常见的21种细菌与白假丝酵母菌两两共凝集（co-aggregation）试验发现，它们并不能产生共凝集现象，这些细菌包括链球菌属、孪生球菌属、消化链球菌属、韦荣菌属、乳杆菌属、放线菌属、二氧化碳噬纤维菌属。共凝集作用可以调控相互作用的微生物种群，或是改变宿主环境，使之能控制原住菌和外来菌的平衡。在根龋中可能缺乏这种共凝集作用的调控。

增加真菌的载量也对口腔微生物组结构和组成具有调节作用。随着假丝酵母菌数量增多，唾液微生物组多样性明显下降。特定细菌种属的数量有涨有消，随假丝酵母菌增多而增多的细菌有消极类杆菌、梭杆菌、黄杆菌等，而拟杆菌数量随假丝酵母菌增多而减少。高假丝酵母菌载荷的微生物组多样性降低，形成独特的以糖分解和产酸菌-链球菌为主导的微生物组成。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（一）细菌-真菌间的协同作用

共凝集和共黏附在口腔细菌和白假丝酵母菌相互作用过程中起关键作用。白假丝酵母菌能黏附到多种唾液蛋白表面，因此它在口腔定植的一个早期步骤就是黏附到唾液包被的组织表面。白假丝酵母菌也能黏附到牙菌斑早期定植成员（如链球菌、内氏放线菌）和晚期定植成员（如具核梭杆菌等）。都柏林假丝酵母菌在菌悬液中也能和梭杆菌共凝集。假丝酵母菌和链球菌本质上具有协同作用，如戈氏链球菌、口腔链球菌、血链球菌展示同白假丝酵母菌具有高度的亲和力。戈氏链球菌是口腔的正常定植菌，能增强白假丝酵母菌的生存和抗性，因此对白假丝酵母菌感染进程有促进作用（图 4-6）。戈氏链球菌能与白假丝酵母菌共凝集、促进生物膜形成、促进白假丝酵母菌菌丝相转化、为其提供碳源等代谢产物、促进其他细菌和真菌的积聚等，最终导致这种细菌-真菌感染经久难治。微小消化链球菌和白假丝酵母菌也频繁分离自根管样本和牙髓持续感染样本中，这提示假丝酵母菌也可能在持续性根尖周炎和牙髓坏死性根管感染中起重要作用。临床上更重要的发现是白假丝酵母菌和葡

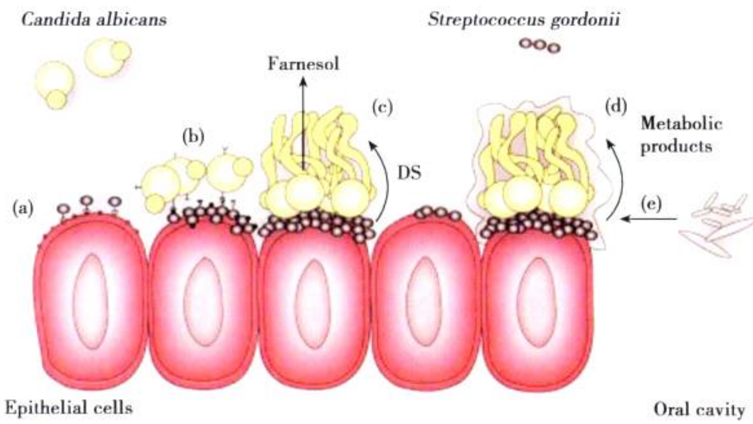


图 4-6　戈氏链球菌和白假丝酵母菌的协同作用

注：其作用机制如下：戈氏链球菌能表达复杂的细胞表面多肽（Ag Ⅰ/Ⅱ）：（a）通过识别宿主组织蛋白和细胞受体从而黏附到上皮细胞。戈氏链球菌黏附后，白假丝酵母菌能通过蛋白-蛋白相互作用黏附到它表面，或直接识别已经被戈氏链球菌吸附的唾液蛋白，如基础脯氨酸富集蛋白（basic proline-rich proteins，bPRPs）。（b）细菌和白假丝酵母菌共凝集，促进生物膜形成、细胞间密切交流。（c）通过扩散信号分子（diffusible signal，DS）作用，戈氏链球菌抑制法尼醇（farnesol）介导的菌丝形成抑制作用，因此增强了白假丝酵母菌形成生物膜和侵袭组织的潜力。（d）链球菌也通过分泌代谢产物作用白假丝酵母菌的碳源促进其生长；同时，白假丝酵母菌通过减少氧压和提供细菌生长刺激因子也能增强戈氏链球菌的存活和定植。（e）形成成熟的细菌-真菌生物膜，包绕细胞外基质，利于其他的细菌或真菌的积聚。这些相互作用可以使口腔感染更持久并且难以治疗。来自文章：Morales DK，Hogan DA. Candida albicans interactions with bacteria in the context of human health and disease. PLoS Pathog，2010，6（4）：e1000886. doi：10.1371/journal. ppat. 1000886

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

萄球菌在患者口腔的共定植和共感染,50 例义齿性口炎患者,其中 39 例同时定植了白假丝酵母和金黄色葡萄球菌。它们可能以混合生物膜形式存在,难以用抗生素和抗真菌的药物治疗。虽然具体机制还没有完全阐明,但葡萄球菌蛋白酶能增强白假丝酵母菌对黏膜的黏附作用。药物敏感性研究显示真菌细胞能调节抗细菌药物活性,葡萄球菌也能影响生物膜的抗真菌剂活性。

(二) 细菌-真菌间的拮抗作用

乳杆菌能拮抗白假丝酵母菌生长。乳杆菌通过竞争黏附位点、分泌生物表面活性剂、释放 H_2O_2、乳酸或脂肪酸、产生细菌素样物质等减少白假丝酵母菌对上皮细胞黏附(图 4-7)。这种拮抗作用也发生在女性阴道,乳杆菌是正常定植菌,96% 的健康妇女的微生物群种含有产生 H_2O_2 的乳杆菌,而阴道炎妇女乳杆菌比例相当低。

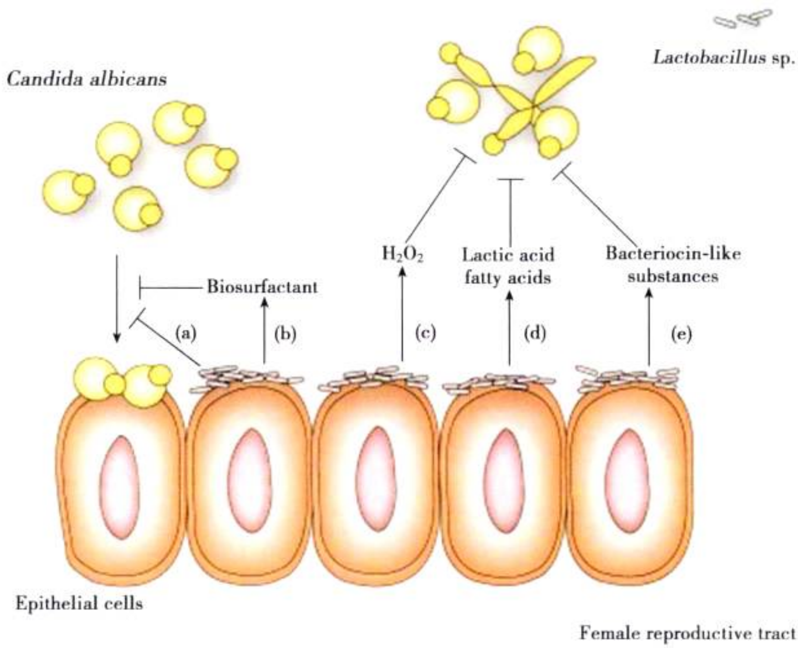


图 4-7 乳杆菌对白假丝酵母菌的抑制作用

注:乳杆菌减少了白假丝酵母菌对上皮细胞黏附通过以下途径:(a)竞争黏附位点,乳杆菌对黏附位点有更高亲和力。(b)分泌生物表面活性剂,如细菌表面乳糖(surlactin),减少真菌结合;大部分乳杆菌能释放(c)H_2O_2 和(d)乳酸或脂肪酸,抑制白假丝酵母菌增殖和侵袭性菌丝形成。(e)乳杆菌产生的细菌素样物质能抑制真菌生长或直接减少它的载荷。来自文章:Morales DK, Hogan DA. Candida albicans interactions with bacteria in the context of human health and disease, 2010, 6(4):e1000886. doi:10.1371/journal.ppat.1000886

铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌也具有拮抗作用,它能作用于白假丝酵母菌的菌丝相,在菌丝上形成致密的生物膜,从而杀死真菌,虽然这种作用只发生在生物膜形成的起始阶段。通过构建铜绿假单胞菌的突变株,菌毛和分泌分子等毒力因子能协同杀死真菌菌丝,因此,细菌毒力因子可能参与细菌-真菌相互作用。进一步研究发现,铜绿假单胞菌能显著影响白

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

假丝酵母菌菌细胞形态。但铜绿假单胞菌并不能黏附、杀死白假丝酵母菌的酵母相。相似的拮抗作用也发现在白假丝酵母菌和鲍曼不动杆菌之间。鲍曼不动杆菌抑制假丝酵母菌转化为菌丝相，从而减弱其毒力。白假丝酵母菌通过产生法尼醇（farnesol）能抑制鲍曼不动杆菌生长。口腔黏性放线菌、溶牙放线菌和内氏放线菌对白假丝酵母菌的体外生长也有抑制作用。

（三）细菌-真菌混合感染作用机制

细菌对于真菌的作用及其机制是多方面的（表4-4），在不同的细菌种属和环境中，可能起协同作用，也可能是拮抗作用。这种相互作用高度依赖生态环境中包括细菌、真菌本身以及周围微生物群落和宿主环境等多种因素。

表4-4　细菌对于真菌形态、生长、毒力、存活和黏附的影响

细菌对真菌作用范畴	作用方式
形态	产生特异的形态调节复合物
	改变环境（pH、营养等）
生长	改变营养供给
	细菌产生有助真菌生长的因子
毒力	直接或间接作用于真菌毒力因子的产生
	细菌产生的分子能作为真菌次级代谢产物的前身
	产生抗真菌复合物
存活	改变环境促进真菌死亡或存活
	防止抗生素对混合生物膜作用
	共积聚
黏附	竞争性抑制黏附位点

注：引自 Wargo MJ, Hogan DA. Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. Curr Opin Microbiol, 2006, 9(4): 359-364

三、病毒与细菌种群的生态链

细菌与病毒共感染的情况在医学上随处可见。世界上流感病毒的大流行往往导致继发性细菌性肺炎的发病，引起肺炎的细菌包括有肺炎链球菌、流感嗜血菌、金黄色葡萄球菌、卡他莫拉菌等；胃肠炎也常常与病毒（轮状病毒、腺病毒、星状病毒等）和细菌（脆弱拟杆菌、大肠埃希菌、沙门菌、志贺菌等）的混合感染有关。HIV感染能引起各种严重的细菌、真菌和病毒感染，牙龈卟啉单胞菌能上调HIV-1的R5特异的共受体CCR5的水平。牙周生物膜的各种革兰阳性菌和革兰阴性菌也能再次激活潜伏在T细胞、巨噬细胞和树突细胞中的HIV。

细菌-病毒共感染在动物模型中也得到了广泛研究。鼠巨细胞病毒和牙龈卟啉单胞菌混合感染与单独感染相比，老鼠的死亡率被显著提高；这是由于老鼠体内抗病毒的γ-干扰素水平显著降低了，因此也增加了细菌和病毒共感染的致病性和致死率。人们认为，疱疹病毒的潜伏感染也可能上调机体固有免疫，增强宿主的防疫功能。如潜伏感染的鼠EB病毒或巨细胞病毒能使老鼠对病原性细菌鼠疫耶尔森菌、单核细胞增多性李斯特菌的感染具有抵抗

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

力，然而，这种保护效应是暂时的，仅能持续几个月时间而已。

因此，大量的疾病和动物实验的研究认为病毒-细菌共感染较之单一微生物感染能引起更多、更严重的疾病。早期研究认为共感染可能降低了病原细菌的清除率、增强其致病性，最近的研究也指出可能是增强了病毒的毒力。因为上百万的疱疹病毒和细菌能定植在牙周位点，因此，疱疹病毒和细菌相互作用在人牙周炎的发展中也可能扮演重要角色。

（一）牙周疾病的疱疹病毒-细菌作用

在人体牙周袋中，疱疹病毒 EB（Epstein-Barr virus，EBV）和人巨细胞病毒（human cytomegalovirus，HCMV）的 DNA 分别是 8.3×10^8 和 4.6×10^5 拷贝，在牙周损害和龈炎组织中它们的拷贝数更高。牙周炎位点中 EB 病毒和 HCMV 病毒感染阳性率在 80% 左右，而在正常组织仅约 20%。综合了既往多项研究结果发现，EB 病毒在进展性牙周炎、慢性牙周炎、龈炎、健康或正常牙周组织中阳性百分率中位数（percentage median）分别是 65%、49%、22%、8%；而 HCMV 在上述组织中的阳性率分别是 44%、44%、24%、17%。因此，疱疹病毒在牙周炎感染中检出率高。同时，它常常合并牙周细菌感染。17% EB 阳性和 54% HCMV 阳性的牙周损害患者中，包含 6～8 种主要的牙周致病菌，如牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦那菌、中间普雷沃菌、变黑普雷沃菌、伴放线菌凝集菌、直形弯曲菌、齿垢密螺旋体等，其中与具有高致病潜力的牙龈卟啉单胞菌、齿垢密螺旋体最为密切相关。表 4-5 中显示了 EB 病毒、巨细胞病毒和牙周细菌共感染的比值比。HCMV、牙龈卟啉单胞菌与局限性青少年牙周炎的比值比（odds ratios）分别是 4.6 和 7.8，但两者共感染比值比高达 51.4，患病的风险大幅度增高。日本的研究显示 EB 阳性牙周炎患者牙龈卟啉单胞菌占总唾液细菌的 0.25%，而 EB 阴性患者只占 0.02%，差异有 13 倍之多。

表 4-5 EB 病毒、巨细胞病毒和牙周细菌间的关联作用

病毒	细菌或疾病	比值比	*P* 值
EBV-1	牙周炎严重度	5.1	0.05
	牙龈卟啉单胞菌	3.4	0.01
	牙龈卟啉单胞菌+中间普雷沃菌	4.4	0.005
	中间普雷沃菌+齿垢密螺旋体	4.2	0.004
	牙龈卟啉单胞菌+变黑普雷沃菌	2.7	0.05
	牙龈卟啉单胞菌+福赛斯坦纳菌+齿垢密螺旋体	4.1	0.005
	牙龈卟啉单胞菌+变黑普雷沃菌+齿垢密螺旋体	3.3	0.03
HCMV	牙周炎严重度	4.7	0.03
	牙龈卟啉单胞菌+变黑普雷沃菌	3.2	0.01
	牙龈卟啉单胞菌+变黑普雷沃菌+齿垢密螺旋体	2.6	0.05
	牙龈卟啉单胞菌+福赛斯坦纳菌+变黑普雷沃菌	3.2	0.01

注：改编自 Slots J. Herpesviral-bacterial interactions in periodontal diseases. Periodontol 2000，2010，52（1）：117-140

单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）也可能参与牙周疾病致病。HSV-1 合并牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦那菌、中间普雷沃菌、伴放线菌凝集菌感染同牙周炎、坏死性牙髓炎患病有关。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

除了单种疱疹病毒合并细菌感染引起牙周炎外，两种病毒共感染可导致严重的口腔疾病，如 EBV-HCMV 共感染引起进展性牙周炎、慢性牙周炎、牙周脓肿、急性坏死性溃疡性龈炎、根尖周损害和口腔溃疡等。HCMV-HSV 共感染与进行性龈炎和牙周组织黏附丧失有关。实验室数据也显示，EB-1 和 HCMV 共感染可诱导牙龈卟啉单胞菌和伴放线菌嗜血菌数量明显增多。

（二）疱疹病毒-细菌共感染的致病机制

两种疱疹病毒的共同感染可能是交互转录激活了潜伏病毒基因，即一种病毒的基因产物驱动另一种病毒的转录，两种活化病毒，每一种提供自己独特的毒力因子，能导致特异的严重免疫系统破坏，加速疾病进程。

疱疹病毒-细菌共感染的牙周炎发生发展的决定因素有以下五方面，包括牙周炎位点的高疱疹病毒载量、牙周疱疹病毒激活、抗病毒细胞毒性 T 淋巴细胞反应缺失、特异性牙周病原菌存在、抗细菌抗体反应不足。

疱疹致病性是复杂的，可通过直接病毒感染和复制或通过病毒诱导宿主免疫防御的改变。牙周炎早期免疫反应是宿主固有免疫占优势，涉及致细胞病变效应，而大部分细胞免疫活性表现是细胞或体液免疫反应。

疱疹病毒可以引起成纤维细胞、角质细胞、上皮细胞、炎症细胞、多形核白细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、骨细胞的细胞病变效应。EBV 和 HCMV 也可以感染和改变牙周炎损害部位单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞功能。作为疱疹性牙周炎感染、侵袭性牙周炎的结果，相比于慢性牙周损害或健康牙周位点，可能包含更多的 T 抑制性细胞和 B 淋巴细胞。

牙周疱疹病毒感染可能增加了牙周微生物组的致病性。表达在真核细胞膜上的疱疹病毒蛋白能作为新的细菌连接位点，巨细胞病毒能增强伴放线菌凝集杆菌对原代培养的牙周袋上皮细胞的黏附；疱疹病毒可引起中性粒细胞异常的黏附、趋化、吞噬和杀菌作用，而中性粒细胞在控制牙周细菌方面起着至关重要的作用。EB 病毒活动性感染，也可以产生中性粒细胞抗体和白细胞减少，并刺激 B 细胞的增殖和分化。可能因为这些原因，牙周双重感染，巨细胞病毒和 EB 病毒或巨细胞病毒和单纯疱疹病毒，往往引起严重类型的牙周炎。

疱疹病毒和细菌之间的相互作用可能是双向的，细菌酶或其他致炎因子具有潜在激活牙周疱疹病毒活性。感染鼠巨细胞病毒-牙龈卟啉单胞菌的小鼠死亡率显著高于感染鼠巨细胞病毒-大肠埃希菌的小鼠。牙龈卟啉单胞菌抑制干扰素抗病毒反应的潜力可能部分解释巨细胞病毒致病性的增强。

病毒和细菌的抗原诱导的免疫反应往往是一个复杂的级联事件，涉及细胞因子、趋化因子和其他炎症介质，EB 病毒和巨细胞病毒感染上调白介素-1β 和肿瘤坏死因子 α，前炎性细胞因子的增加增强了牙周组织破坏的风险。

（三）临床指导意义

传统的牙周治疗能减少牙周疱疹病毒含量。对 21 名患者进行机械清创术，可使其中 12 名患者 EB 病毒再次检测阴性，其余患者的 EB 病毒基因含量也降低 6 倍，巨细胞病毒降低 38 倍。另一项研究对牙周炎患者再次进行清创术，24 名牙周炎患者不再产生 HCMV，但仍有 EB 病毒和疱疹病毒-7 型。由此看来，巨细胞病毒对牙周治疗特别敏感。传统的牙周治疗也能减少唾液中的 EB 病毒拷贝量 13 倍和巨细胞病毒 65 倍。2 名 Kostmann 综合征的儿童 EB 病毒量更是减少了 100 倍，由 946 000 降到了 9010；这也提示，牙周疾病位点可能是唾

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

液疱疹病毒的重要来源。

牙周炎疱疹病毒-细菌作用模式提供了疾病预防和治疗的新模式。在对一例龈下高 EB 病毒含量的难治性牙周炎患者使用抗疱疹病毒药物伐昔洛韦治疗 10 天后,EB 病毒被显著抑制,至少 1 年都检测不到病毒,而且临床症状显著改善。这就对牙周炎患者进行病毒筛选、是否进行抗病毒干预的临床疗法提供了理论依据。化学药物治疗能有效地杀死裂解期的病毒,但对潜伏期的病毒没有作用,这就限制了它的临床应用。将来应用抗疱疹病毒的免疫疗法可能更有前景,或者是用预防性疫苗,或者是治疗性疫苗,这样通过刺激免疫系统抵抗口腔病毒性疾病。

第四节　口腔微生物新种

细菌是人口腔微生物的优势种群,并不断有新的种属被发现和命名以及分类位置的变动。2009—2012 年发表在 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 上从人口腔分离的 5 个新属和 16 个新菌种(表 4-6)将分述如下。

表 4-6　2009—2012 年口腔新种属一览

细菌中文名称	细菌拉丁文名	来源(人)	时间(年)
新菌属:			
锥形杆菌属	*Pyramidobacter*	口腔牙源性脓肿	2009
拟普雷沃菌属	*Alloprevotella*	口腔	2012
依赖杆菌属	*Fretibacterium*	龈下菌斑	2012
毛绒样厌氧杆菌属	*Lachnoanaerobaculum*	健康年轻人唾液	2012
口腔杆菌属	*Stomatobaculum*	龈下菌斑	2012
新菌种:			
鱼腥味锥形杆菌	*Pyramidobacter piscolens*	口腔牙源性脓肿	2009
口腔放线菌	*Actinomyces oris*	痰液	2009
约翰森放线菌	*Actinomyces johnsonii*	健康儿童口腔龈沟	2009
产酸丙酸杆菌	*Propionibacterium acidifaciens*	口腔龋蚀病灶位	2009
彩虹普雷沃菌	*Prevotella micans*	口腔	2009
橘红色普雷沃菌	*Prevotella aurantiaca*	牙周炎患者牙周袋	2010
解糖普雷沃菌	*Prevotella saccharolytica*	牙菌斑	2010
深黑色普雷沃菌	*Prevotella fusca*	龈下菌斑	2011
靶心普雷沃菌	*Prevotella scopos*	口腔种植体	2011
褐色类香味菌	*Myroides phaeus*	儿童的唾液	2011
韦格斯卡多维亚菌	*Scardovia wiggsiae*	口腔及其他临床样本	2011
灰色拟普雷沃菌	*Alloprevotella rava*	口腔	2012
苛求依赖杆菌	*Fretibacterium fastidiosum*	龈下菌斑	2012
口腔毛绒样厌氧杆菌	*Lachnoanaerobaculum orale*	健康年轻人唾液	2012
长口腔杆菌	*Stomatobaculum longum*	口腔黏膜组织	2012
当别町韦荣菌	*Veillonella tobetsuensis*	健康成人舌生物膜	2012

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

一、新菌属

(一) 锥形杆菌属(*Pyramidobacter*)(Downes et al. 2009)

命名:*Pyramidobacter*(Py. ra. mi. do. bac,ter. Gr. n. pyramis-idospyramid;L. n. pyramispyramid;N. L. masc. n. bacter a rod;N. L. masc. n. Pyramidobactera rod that forms pyramid-like colonies),指形成锥形样(金字塔形)菌落的杆菌:锥形杆菌属。

细胞是专性厌氧、无芽胞、无动力的革兰阴性杆菌。

PYG 肉汤培养物产生的终末代谢产物主要是醋酸、少量的异戊酸和痕迹量到少量的丙酸、异丁酸、琥珀酸、苯乙酸。

模式种是鱼腥味锥形杆菌(*Pyramidobacter piscolens*)。

模式种的 DNA G+C 含量是 59mol%。

(二) 拟普雷沃菌属(*Alloprevotella*)(Downes et al. 2012)

命名:*Alloprevotella*(Al. lo. prev. o'tell. a. Gr. adj. *allos* different;N. L. fem. n. *Prevotella* a bacterial generic name;N. L. fem. n. *Alloprevotella* organism different from,but related to,the genus *Prevotella*),指该菌属与普雷沃菌有相关性但存在差异,故命名为拟普雷沃菌属。

细胞是专性厌氧、无芽胞、无动力的革兰阴性杆菌。

水解明胶,但不水解精氨酸和尿素。不还原硝酸盐。在含 20% 胆汁的肉汤中不生长。

主要的细胞长链脂肪酸是 anteiso-$C_{15:0}$、iso-$C_{15:0}$、$C_{16:0}$ 和 3OH iso-$C_{17:0}$。

发酵碳水化合物的终末代谢产物是醋酸和琥珀酸。

模式种:坦纳拟普雷沃菌(*Alloprevotella tannerae*)。

模式种的 DNA G+C 含量:45 ~47mol%。

来源:人的口腔。

(三) 依赖杆菌属(*Fretibacterium*)(Vartoukian et al. 2012)

命名:*Fretibacterium*(Fre. ti. bact. er'ium. L. adj. fretus depending on;L. neut. n. bacterium, a rod;N. L. neut. n. Fretibacterium,depending rod,referring to the dependence of this organism on co-culture for good growth)。因该菌属细菌良好的生长需要依靠助生菌,如具核梭杆菌,故命名为依赖杆菌属。

细胞是专性厌氧、有动力的革兰阴性弯曲杆菌。

适当的生长温度是 37℃,pH 是 6 ~7。不分解糖,产生 H_2S,不产生触酶和吲哚,不水解七叶苷、精氨酸和脲酶,不还原硝酸盐。

在 PYG 肉汤的主要终末代谢产物是醋酸和中等量的丙酸。

主要的细胞脂肪酸是 $C_{14:0}$、$C_{18:0}$ 和 $C_{16:0}$。

模式种:苛求依赖杆菌(*Fretibacterium fastidiosum*)。

模式种的 DNA G+C 含量:63mol%。

(四) 毛绒厌氧杆菌属(*Lachnoanaerobaculum*)(Hedberga M et al. 2012)

命名:*Lachnoanaerobaculum*(Lach. no. an. a. e. ro. ba'cu. lum. Gr. n. *lachnos* wool;Gr. *suff.* an-negating suffix,*Gr. n. aer* air,L. neut. n. *baculum rod*;M. L. neut. n. *Lachnoanaerobaculum* anaerobic rods forming woolly colonies)。指形成毛绒样菌落的厌氧的杆菌而命名为:毛绒厌氧杆菌属。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

专性厌氧，革兰染色阳性但容易脱色染成革兰阴性的芽胞杆菌。

在血琼脂平板上菌落外形为可变的斑点及扩散，边缘为啮蚀状或须根状。一些菌落可为扁平状或锥体状。最适生长温度是37℃，pH是6.5～7.5。

发酵碳水化合物，但不水解蛋白。

在PYG肉汤的主要终末代谢产物是醋酸和丁酸。

主要的细胞脂肪酸是$C_{14:0}$、$C_{18:0}$和$C_{16:0}$。

模式种：于默奥毛绒厌氧杆菌（*Lachnoanaerobaculum umeaense*），菌种号为CCUG 58757^T（=DSM 23576^T）。

模式种的DNA G+C含量：35%～38%。分离自人的口腔、小肠、血和羊水。

（五）口腔杆菌属（*Stomatobaculum*）（Sizova et al. 2012）

命名：*Stomatobaculum*（Sto. ma. to. ba'cu. lum. Gr. n. *stoma-atos*, mouth; L. neut. N. *baculum*, stick, rod; N. L. *neut*. N. *Stomatobaculum*, mouth rod, because the organism was first isolated from the human mouth）。因最初的分离处为口腔得名：口腔杆菌属。

细胞是严格厌氧的、无动力、无芽胞的革兰阳性长杆菌，常常见肿胀细胞。菌细胞大小是（0.5～0.8）μm×（4～40）μm，单个或成对排列，弯曲的丝状体可长达200μm。

生长温度是30～42℃，pH范围是4.9～7.5。酵母提取物、胰蛋白胨、牛奶、柠檬酸盐、葡萄糖和麦芽糖可促进生长。

触酶、氧化酶和脲酶是阴性。不还原硝酸盐。

主要的细胞脂肪酸是：$C_{14:0}$（39.9%），$C_{14:0}$ DMA（7.7%），$C_{6:0}$（8.9%），$C_{16:1}$ ω7c DMA（15.2%）。

发酵葡萄糖的主要终末代谢产物是丁酸、乳酸、异戊酸和醋酸。

模式种：长口腔杆菌（*Stomatobaculum longum*）。

16S rRNA序列分析结果表明口腔杆菌属于毛螺菌科（family Lachnospiraceae）。

二、新菌种

（一）鱼腥味锥形杆菌（*Pyramidobacter piscolens*）（Downes et al. 2009）

命名：*Pyramidobacter piscolens*（pis. co'lens. L. n. *piscisisfish*; L. part. adj. *olens* smelling; N. L. part. adj. *piscolens* smelling of fish）。因培养物有特别的鱼腥味而得名：鱼腥味锥形杆菌。

专性厌氧、无芽胞、无动力的革兰阴性杆菌，菌细胞大小是（0.7～0.8）μm×（0.8～2.2）μm。在FAA琼脂厌氧培养7天后，形成直径0.7～1.1mm、圆形、边缘完整、明显突起到锥形体、光滑、光泽、不透明、苍白色到灰色的菌落。培养物有明显的鱼腥味。

在PY肉汤、PYG肉汤和BHI肉汤呈跨度生长，增加碳水化合物不促进其生长。

在DP和PY培养基加入10mM甘氨酸可刺激其生长，但不利用丙氨酸、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸和赖氨酸。不发酵阿拉伯糖、纤维乙糖、果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、甘露糖、松三糖、鼠李糖、水杨素、蔗糖、海藻糖和木糖。产生H_2S。不水解精氨酸、七叶苷和尿素。不产生触酶和吲哚，不还原硝酸盐。在含20%胆汁的肉汤中不生长。

模式株：W5455^T（=DSM 21147^T=CCUG 55836^T），分离自人口腔的牙源性脓肿。

模式株的DNA G+C含量：59mol%。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(二) 口腔放线菌(*Actinomyces oris*)(Henssge et al. 2009)

命名:*Actinomyces oris*(o'ris. L. gen. n. *oris* of the mouth)。因分离自口腔得名:口腔放线菌。该菌种包括原先鉴定为内氏放线菌血清型Ⅱ、Ⅲ和NV以及黏性放线菌血清型Ⅱ的菌株。这些菌株原命名为内氏放线菌基因型2型和尚未能命名的内氏放线菌基因型菌株。

生物学特性与内氏放线菌基因型2型相同(Johnson et al. 1990)。通过*atpA*或*metG*基因序列检测可与其他相关菌种相鉴别。

模式株是ATCC 27044ᵀ(=CCUG 34288ᵀ),分离自人的痰液。

模式株的DNA G+C含量是66mol%。

(三) 约翰森放线菌(*Actinomyces johnsonii*)(Henssge et al. 2009)

命名:*Actinomyces johnsonii*(john. so'ni. i. N. L. gen. n. *johnsonii* of Johnson, named after the American molecular taxonomist John L. Johnson, who undertook extensive studies on the genetic relationships between oral actinomyces)。以美国分子分类学家John L. Johnson的名字命名:约翰森放线菌,以表彰他在口腔内放线菌菌种遗传学关系方面进行的大量研究。约翰森放线菌包括原先鉴定为内氏放线菌血清型WVA 963型和内氏放线菌基因型WVA 963型的菌株。

生物学特性与内氏放线菌基因型WVA 963型相同(Johnson et al. 1990)。

通过*atpA*或*metG*基因序列检测可与其他相关菌种鉴别。

模式株是ATCC 49338ᵀ(=CCUG 34287ᵀ),分离自健康儿童的龈沟。

模式株的DNA G+C含量是67mol%。

(四) 产酸丙酸杆菌(*Propionibacterium acidifaciens*)(Downes and Wade 2009)

命名:*Propionibacterium acidifaciens*(a. ci. di. fa'ci. ens. N. L. n. *acidum* acid; L. v. *facio* to produce; N. L. part. adj. *acidifaciens* acid-producing)。因该菌种产生丙酸得名:产酸丙酸杆菌。

厌氧的、无芽胞、无动力、多形态的革兰阳性杆菌。细胞大小是(0.7~0.8)μm×(1.2~4)μm。

在FAA琼脂培养6天后,形成直径0.7~1.1mm、圆形、边缘完整、明显突起、不透明的白色到苍白色的菌落。肉汤培养物为中度混浊,增添碳水化合物可明显促进生长。

发酵果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、甘露糖、密二糖、棉籽糖、鼠李糖、核糖和蔗糖产酸,但不发酵L-阿拉伯糖、纤维乙糖、松三糖和水杨素。不水解精氨酸、七叶苷、明胶和尿素。不产生吲哚和触酶。不还原硝酸盐。在含20%胆汁培养基中有少量生长。

在PYG肉汤中的主要终末代谢酸是大量的丙酸和醋酸以及中等量的琥珀酸。

模式株是C3M_31ᵀ(=DSM 21887ᵀ=CCUG57100ᵀ),分离自人口腔的龋蚀部位。

模式株的DNA G+C含量是70mol%。

(五) 彩虹普雷沃菌(*Prevotella micans*)(Downes et al. 2009)

命名:*Prevotella micans*(mi'cans. L. part. adj. *micans* sparkling, referring to the sparkling, iridescent appearance of the colonies of the organism growing on agar media)。因形成闪烁的彩虹样菌落得名:彩虹普雷沃菌。

专性厌氧、无动力、产生色素的革兰阴性杆菌,菌细胞大小是0.7μm×(1.5~5.0)μm。

在FAA琼脂平皿上培养5天后,形成直径是1.2~1.8mm、圆形、突起、不透明的、边缘完整的彩虹色菌落。菌落内部呈闪烁斑驳状,亮粉色或红褐色,周围为奶油色。在肉汤培养

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

基为中度混浊生长，添加可发酵的碳水化合物可明显促进生长。

细胞酵解糖，可发酵纤维二糖、果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、密二糖、棉籽糖、水杨素和蔗糖，但不酵解阿拉伯糖、甘露醇、松三糖、鼠李糖、核糖、山梨醇、海藻糖和木糖。水解明胶，不水解精氨酸、七叶苷和尿素。产生吲哚。不产生触酶，不还原硝酸盐。在含20%胆汁的培养基中不生长。

Rapid ID32A 生化鉴定系统：α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、α-葡糖苷酶、N-乙酰-β-氨基葡糖苷酶、α-岩藻糖苷酶、碱性磷酸酶、亮氨酰甘氨酸芳基酰胺酶、丙氨酸芳基酰胺酶均为阳性。β-葡糖苷酶和谷酰基谷氨酸芳基酰胺酶为弱阳性或反应不定。

在 PYG 肉汤的主要终末代谢产物是醋酸、异戊酸和琥珀酸，痕迹量到少量的异丁酸。

模式株是 E7. 56^T(= DSM 21469^T = CCUG 56105^T)，分离自人的口腔。

模式株的 DNA G+C 含量是 46mol%。

（六） 橘红色普雷沃菌(*Prevotella aurantiaca*)(Sakamoto et al. 2010)

命名：*Prevotella aurantiaca*(au. ran. ti. a' ca. N. L. fem. adj. *aurantiaca* orange-coloured)。因产生橘红色菌落得名：橘红色普雷沃菌。

专性厌氧、无芽胞、无动力、产生色素的革兰阴性球杆菌，菌细胞大小是(0.5～0.8)×1.6μm 或 0.8×(0.9～1.0)μm。37℃厌氧培养 48 小时后，在 EG 琼脂平皿上形成直径 1～2mm、圆形、边缘整齐、微突起、不透明、光滑的浅棕色到深棕色菌落。在紫外光(365nm)下菌落可见橘红色荧光。20% 胆汁可抑制其生长。

发酵葡萄糖、麦芽糖、D-甘露糖、棉籽糖和蔗糖产酸，但不酵解 L-阿拉伯糖、纤维二糖、甘油、乳糖、D-甘露醇、松三糖、L-鼠李糖、水杨素、D-山梨醇、海藻糖和 D-木糖。产生吲哚。液化明胶，不水解七叶苷。不产生触酶和脲酶。Rapid ID32A 生化鉴定系统：α-葡糖苷酶、α-墨角藻糖苷酶、碱性磷酸酶、精氨酸芳基酰胺酶、亮氨酰甘氨酸芳基酰胺酶、丙氨酸芳基酰胺酶和谷酰基谷氨酸芳基酰胺酶为阳性。脲酶、精氨酸脱氢酶、α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、6-磷酸-β-半乳糖苷酶、β-葡糖苷酶、α-阿拉伯糖苷酶、葡萄糖醛酸酶、N-乙酰-β-氨基葡糖苷酶、谷氨酸脱羧酶等为阴性。不还原硝酸盐。

在 PYG 肉汤的主要终末代谢产物是醋酸、异戊酸和琥珀酸，有很少量的异丁酸。

主要的细胞脂肪酸是 anteiso-$C_{15:0}$、iso-$C_{17:0}$ 3-OH 和 $C_{18:1}$ ω9c。

模式株是 $OMA31^T$(= JCM 15754^T = $CCUG57723^T$)，分离自牙周炎患者的牙周袋。

模式株的 DNA G+C 含量是 39.7mol %。

（七） 解糖普雷沃菌(*Prevotella saccharolytica*)(Downes et al. 2010)

命名：*Prevotella saccharolytica*(sac. cha. ro. ly' ti. ca. Gr. n. *saccharon* sugar; N. L. fem. adj. *lytica* from Gr. fem. adj. *lutike* ^ able to loosen; N. L. fem. adj. *saccharolytica* saccharolytic, breaking own multiple sugars)。因其酵解糖的特性得名：解糖普雷沃菌。

专性厌氧、无芽胞、无动力、不产色素的革兰阴性杆菌，菌细胞大小是(0.6～0.7)μm×(0.9～5)μm。最适生长温度是 35℃，pH 是 7。在 FAA 琼脂平皿上培养 4 天后，形成直径 0.9～1.2mm、圆形、边缘完整、突起、光滑、不透明、中心为灰白色的灰色菌落。

在肉汤培养基为中度混浊生长，添加可发酵的碳水化合物可明显促进生长。

发酵阿拉伯糖、纤维二糖、果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、棉籽糖、水杨素和蔗糖产酸，但不酵解甘露醇、松三糖、山梨醇和海藻糖。水解七叶苷和明胶(弱反应)，不水解精氨酸

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

和尿素。不产生触酶和吲哚。不还原硝酸盐。在含20%胆汁的肉汤中不生长。

主要的终末代谢产物是中等量的醋酸和琥珀酸。

主要的细胞长链脂肪酸是 $C_{16:0}$、iso-$C_{14:0}$、$C_{14:0}$、anteiso-$C_{15:0}$、iso-$C_{16:0}$和 $C_{16:0}$3-OH。

模式株是 D033B-12-2^T(=DSM 22473^T=CCUG57944^T)，模式株和菌株 D080A-01 均分离自人口腔的牙菌斑。

模式株的 DNA G+C 含量是44mol %。

在人口腔微生物组数据库的分类单元是口腔781(http://www.homd.org)。

(八) 深黑色普雷沃菌(*Prevotella fusca*)(Downes and Wade. 2011)

命名:*Prevotella fusca*(fus'ca. L. fem. adj. *fusca* dark-coloured, relating to the dark colour of colonies of the type strain)。因形成深黑色菌落得名:深黑色普雷沃菌。

专性厌氧、无芽胞、无动力的革兰阴性杆菌，细胞大小是0.8μm×(1.2~6.0)μm。

在FAA琼脂平皿上培养4天后，形成直径1.8~2.2mm、圆形、边缘完整、明显突起到锥体状、不透明、表面粗糙无光泽的灰白色菌落。延长培养时间在菌落中央可形成深黄色到深褐色的色素。在肉汤培养物为中度混浊生长，添加可发酵的碳水化合物可促进生长。

发酵纤维二糖、果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、棉籽糖、核糖和蔗糖产酸，但不酵解阿拉伯糖、甘露醇、松三糖、鼠李糖、山梨醇、海藻糖和木糖。水杨素是弱发酵。

不水解明胶、精氨酸、七叶苷和尿素。不产生触酶和吲哚。不还原硝酸盐。在含20%胆汁的肉汤中不生长。

在PYG肉汤中主要的终末代谢产物是琥珀酸、中等量的醋酸和少量的乳酸。

主要的细胞长链脂肪酸是 anteiso-$C_{15:0}$、3-OH iso $C_{17:0}$、3-OH $C_{16:0}$、iso-$C_{15:0}$和 $C_{16:0}$。

模式株是 W1435^T(=DSM 22504^T=CCUG57946^T)，分离自人口腔的龈下菌斑。

模式株的 DNA G+C 含量是43mol%。

在人口腔微生物组数据库的分类单元是782(http://www.homd.org)。

(九) 靶心普雷沃菌(*Prevotella scopos*)(Downes and Wade. 2011)

命名:*Prevotella scopos*[sco'pos. L. masc. n *scopos*(nominative in apposition) a mark, aim at which one shoots, referring to the 'bullseye' appearance of older colonies of the type strain]。因模式株的成熟菌落形成标志性的靶心样菌落得名:靶心普雷沃菌。

专性厌氧、无芽胞、无动力、产生色素的革兰阴性杆菌，菌细胞是0.7μm×(0.9~3.0)μm。

在FAA琼脂平皿上培养4天后，形成直径2~3mm、圆形、边缘完整、突起、不透明、光滑、菌落中央呈浅橘红色的灰白色菌落。延长培养时间在菌落中央可见深褐色的色素，形成靶心(bullseye)样菌落。肉汤培养物为中度混浊生长，添加可发酵的碳水化合物可促进生长。

发酵果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、棉籽糖和蔗糖产酸，不酵解阿拉伯糖、纤维二糖、甘露醇、松三糖、鼠李糖、核糖、水杨素、山梨醇、海藻糖和木糖。水解明胶。不水解精氨酸、七叶苷和尿素。不产生触酶和吲哚。不还原硝酸盐。在含20%胆汁的肉汤中不生长。

在PYG肉汤中主要的终末代谢产物是琥珀酸、中等量的醋酸和痕迹量的异戊酸、乳酸。

主要的细胞长链脂肪酸是 anteiso-$C_{15:0}$、3-OH iso-$C_{17:0}$、3-OH $C_{16:0}$、iso-$C_{15:0}$和 $C_{16:0}$。

模式株是 W2052^T(=DSM 22613^T=CCUG 57945^T)，分离自人口腔的种植体。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（十） 褐色类香味菌（*Myroides phaeus*）（Yan et al. 2012）

命名：*Myroides phaeus*（pha'e. us. Gr. adj. *phaios* brown；N. L. masc. adj. *phaeus* brown，referring to the colour of the colonies）。为类香味菌属的新菌种，因产生褐色菌落得名：褐色类香味菌属。

细胞是直杆菌，大小为（0.4～0.5）μm×（0.7～1.2）μm，单个或成对排列。未见滑动动力。

在LB（Luria-Bertani）琼脂上形成圆形、突起、边缘规则的黄色到褐色菌落。色素为扩散性。可在6～37℃生长（最适生长温度是28℃，在4℃或42℃不生长）。生长pH是5.0～10.0（最适pH是8）。生长不要求NaCl，但在6.0% NaCl（w/v）可生长，最适浓度是1.0% NaCl。

发酵肌醇、D-山梨醇、蔗糖和苦杏仁苷产酸，但不发酵D-葡萄糖、D-甘露醇、L-鼠李糖、密二糖和L-阿拉伯糖。产生吲哚和H_2S。还原硝酸盐。水解明胶和DNA，但不水解酪蛋白、Tween 80、琼脂、淀粉、CM-纤维素和蛋黄。精氨酸脱氢酶和脲酶阳性。利用柠檬酸盐、还原亚硝酸盐。β-半乳糖苷酶（ONPG）、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、色氨酸脱氨酶和β-葡糖苷酶活性阴性。在API ZYM系统，碱性磷酸酶、脂酶（C4）、酯酶（C8）、脂酶（C14）、半胱氨酸芳基酰胺酶、酸性磷酸酶和萘酚-色酚-磷酸脱氢酶阳性，但亮氨酸芳基酰胺酶、缬氨酸芳基酰胺酶、胰酶、α-糜蛋白酶、α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、α-葡糖苷酶、β-葡糖苷酶、N-乙酰-β-葡糖酰胺酶、α-甘露糖苷酶和α-墨角藻糖苷酶阴性。

主要的细胞长链脂肪酸是iso-$C_{15:0}$、iso-$C_{17:0}$ 3-OH和iso-$C_{13:0}$。

模式株：MY15^T（=DSM 23313^T=LMG 25566^T），分离自儿童的唾液。

模式株的DNA G+C含量：34.3mol%。

（十一） 韦格斯卡多维亚菌（*scardovia wiggsiae*）（Downes et al. 2011）

命名：*Scardovia wiggsiae*（wiggs'i. ae. N. L. fem. gen. n. *Wiggsiae* of Wiggs，named in honour of Lois Wiggs，American microbiologist，for her contributions to anaerobic microbiology）。用美国微生物学家Lois Wiggs的名字命名，以表彰他在厌氧微生物学研究中的奉献。

厌氧、无芽胞、无动力、革兰阳性的多形态杆菌。菌细胞大小是（0.6～0.7）μm×（1.6～4）μm。形态多样，有直形、微弯曲形和棍棒状。排列也呈多样性，或成对，或短链，或带分支，或类白喉杆菌样排列。在FAA琼脂上培养7天后，形成直径约0.4～1.2mm、圆形、边缘完整、突起、不透明、臼齿样或波浪形、多形态、灰色或苍白色或奶油色的不规则菌落。肉汤培养物为中度混浊，增添碳水化合物可明显促进生长。

发酵D-阿拉伯糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、麦芽糖、棉籽糖、核糖和蔗糖产酸，不产生气体。弱发酵甘露糖。不发酵纤维乙糖、葡聚糖、甘露醇、松三糖、鼠李糖、山梨醇、海藻和木糖。发酵乳糖、密二糖和水杨素不定。不水解L-精氨酸、明胶和尿素。水解七叶苷不定，不产触酶和H_2S。不还原硝酸盐。

在PYG肉汤中的主要终末代谢酸是醋酸和少量到中等量的乳酸。

主要的长链脂肪酸是$C_{16:0}$和$C_{18:1}$ ω9c。

模式株：C1A_55^T（=DSM 22547^T=CCUG 58090^T），分离自人的口腔及其他临床样本。

模式株的DNA G+C含量：55mol%。

在人类口腔微生物组数据库的分类编号是人口腔195（http://www.homd.org）。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（十二）灰色拟普雷沃菌(*Alloprevotella rava*)(Downes et al. 2012)

命名：*Alloprevotella rava*(ra' va. L. adj. *ravus* grey, referring to the colour of colonies of the organism growing on blood-containing agar media)，因在血琼脂平板上形成灰色的菌落，而命名为灰色拟普雷沃菌。

专性厌氧、无动力的革兰阴性杆菌，细胞大小是(0.5～0.6)μm×(1.0～5.0)μm，偶尔可长达10μm，排列呈单个或短链状。生长温度为30～42℃，最适生长温度是35℃。最适pH是7，在pH 6左右可生长，但在pH 5和8不生长。在FAA平板培养3天后，形成直径约0.8～1.4mm、圆形、突起、边缘完整、不透明(菌落内部可见一不透明或半透明的同心环)的灰色菌落。

在肉汤培养基中的生长可变，呈轻度或中度混浊。弱到中度发酵碳水化合物：发酵果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖和甘露糖，但不发酵阿拉伯糖、甘露醇、松三糖、密二糖、棉籽糖、鼠李糖、水杨素、山梨醇、蔗糖、海藻糖和木糖产酸。水解明胶，但不水解精氨酸、七叶苷和尿素。吲哚、触酶和H_2S不产生。不还原硝酸盐。在含20%胆汁的肉汤中不生长。在Rapid ID 32A反应板：α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、6-磷酸-β-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶、β-N-乙酰-氨基葡糖苷酶和α-墨角藻糖苷酶为阳性，发酵甘露糖和棉籽糖阳性。碱性磷酸酶、亮氨酰谷氨酸芳基酰胺酶和丙氨酸芳基酰胺酶为弱反应，谷氨酰谷氨酸芬基酰胺酶反应不定。

在PYG肉汤产生的终末代谢产物主要是琥珀酸和中等量的醋酸，在PY肉汤中也可检出痕迹量到少量的异戊酸。

模式株是81/4-12^T(=DSM 22548^T=CCUG 58091^T)，分离自人的口腔。

模式株的DNA G+C含量是47mol %。

菌种在口腔微生物组数据库的口腔分类单元是302。

（十三）苛求依赖杆菌(*Fretibacterium fastidiosum*)(Vartoukian et al. 2012)

命名：*Fretibacterium fastidiosum*(fas. tid. i. o. sum L. adj. *fastidiosus* fastidious, referring the to nutritional requirements of the organism)。该菌为依赖杆菌属唯一的菌种，因其对营养物的特殊要求而命名为苛求依赖杆菌。

专性厌氧、有动力的革兰阴性弯曲杆菌。菌细胞大小是(1.0～1.5)μm×(2.0～13.0)μm。

适当的生长温度是37℃，pH是6～7。在同时接种有具核梭杆菌的BA琼脂平板上培养21天后，形成直径约为0.5mm、明显突起、光滑、中央不透明、边缘为不规则的半透明环绕的灰白色菌落。偶然也可见无环绕扩散、表面旋绕的黄色菌落。次代培养形成直径约1.3mm、低突、光滑、稍不规则、不透明、中心为灰色到苍白、周围半透明环绕的菌落。哺养细菌(如具核梭杆菌)对刺激其在琼脂和肉汤中的良好生长是必要的。甘氨酸不刺激生长。不发酵果糖、半乳糖、乳糖、麦芽糖和蔗糖产酸。产生H_2S，不产生触酶和吲哚，水解明胶是弱反应，不水解七叶苷、精氨酸和脲酶。不还原硝酸盐。在APIZYM系统，α-糜蛋白酶、酸性磷酸酶、萘酚-色酚-磷酸脱氢酶阳性，脂酶(C4)和酯酶(C8)阳性。在Rapid ID 32A板，亮氨酰谷氨酸芳基酰胺酶和谷氨酸芬基酰胺酶为阳性。

主要的细胞脂肪酸是$C_{14:0}$、$C_{18:0}$和$C_{16:0}$。

PYG肉汤培养物的主要终末代谢产物是醋酸和中等量的丙酸。

模式株：SGP1^T(=DSM 25557^T=JCM 16858^T)，分离自牙周炎患者的龈下菌斑。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

模式株的 DNA G+C 含量:63mol%。

(十四) 口腔毛绒厌氧杆菌(*Lachnoanaerobaculum orale*)(Hedberga M et al. 2012)

命名:*Lachnoanaerobaculum orale*(o. rale. L. neutr. adj. orale, belonging to the mouth, i. e., related to the oral cavity)。为毛绒样厌氧杆菌属的菌种,因其分离自口腔得名:口腔毛绒厌氧杆菌。

专性厌氧、革兰阳性的芽胞杆菌,大小约 5~20μm,常常呈聚集状。

最适生长温度是 37℃,pH 是 6.5~7.5。在 37℃培养 72 小时后,在血琼脂平板上的菌落直径为 1.5~3mm,呈扩散状,球形菌落中心为锥体状、边缘为须根状。一些菌落可为扁平状或锥体状。

产生吲哚、H_2S 和 NH_3。不发酵 17 种常见的糖醇。脲酶阳性。α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖醛酸酶和焦谷氨酸芬基酰胺酶阳性。

主要的细胞脂肪酸是 $C_{14:0}$、$C_{16:0}$ 和 $C_{18:1}$ ω7c。

主要终末代谢产物是丁酸、醋酸和乳酸。

模式株:N1(CCUG 60305^T=DSM 24553^T)。分离自健康年轻人的唾液。

模式株的 DNA G+C 含量:38mol %。

(十五) 长口腔杆菌(*Stomatobaculum longum*)(Sizova et al. 2012)

命名:*Stomatobaculum longum*[lon'gum. L. neut. adj. *longum*, long(in shape)]。菌细胞为长形状得名:长口腔杆菌。

菌细胞描述见长口腔杆菌属。菌落直径是 2~3mm、脐状,边缘为不规则呈波浪形。在 BM 琼脂、TY 肉汤和 TYG 肉汤的培养物可产生黑色素。在 WC 琼脂上不产生溶血和黑色素,但在 BM 琼脂和 TY 肉汤、TPY 肉汤培养物可产生黑色素。

从葡萄糖、麦芽糖和蔗糖产酸,但不发酵阿拉伯糖、纤维乙糖、乳糖、甘露糖、松三糖、棉籽糖、鼠李糖、海藻糖、木糖、甘油、甘露醇、水杨素、山梨醇产酸。不产生吲哚,不水解明胶和七叶苷。模式株对卡那霉素、黏菌素、万古霉素、甲硝唑、青霉素、利福平、红霉素、氨苄西林、四环素和胆汁敏感。耐受磺胺甲噁唑和甲氧苄啶。

模式株是 DSM 24645^T(=230HM-480)。分离自人的龈下菌斑。

模式株的 DNA G+C 含量是 55.05~55.3mol%。

(十六) 当别町韦荣菌(*Veillonella tobetsuensis*)(Mashima et al. 2012)

命名:*Veillonella tobetsuensis*(to. bet. su. en'sis. N. L. fem. adj. tobetsuensis pertaining to Tobetsu in Hokkaido of Japan, where the type strain and three other strains supporting the description of the species were isolated)。因菌种分离自日本北海道的当别町得名:当别町韦荣菌。

严格厌氧、无芽胞、无动力的革兰阴性球菌,菌细胞直径是 0.3~0.7μm,可见漩涡形表面。单个或成对排列。

37℃厌氧培养 5 天后,在 BHI 血琼脂上形成直径约 0.5~2mm、光滑、不透明的浅灰色到白色的圆形菌落,不产生溶血环。在基于碱性品红脱色的 Veillonella 选择琼脂中,未见菌落周围的脱色反应。

触酶阴性。还原硝酸盐。不酵解碳水化合物产酸,也不显示细胞外糖苷酶活性。碱性磷酸酶、焦谷氨酸芳基酰胺酶、酸性磷酸酶和萘酚-色酚-磷酸脱氢酶阳性,厌氧培养条件下在 TGY 培养基不产生气体。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

厌氧培养条件下的主要代谢终末产物是醋酸和丙酸。

主要的细胞长链脂肪酸是 $C_{13:0}$ 和 $C_{17:1}\omega8$。

通过 *dnaK* 和 *rpoB* 基因序列分析,可与其他韦荣菌菌种鉴别。

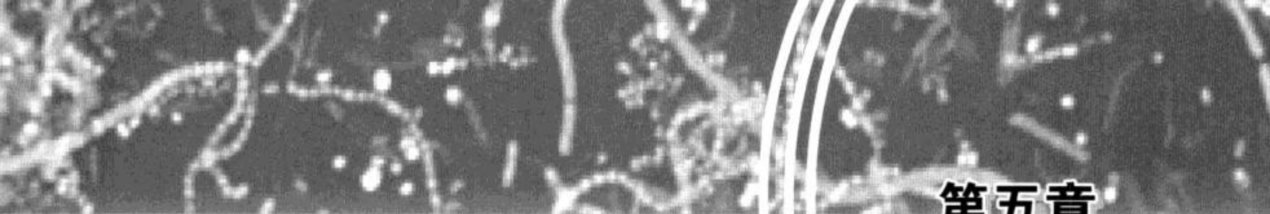
模式株:B16^T(=JCM 17976^T=ATCC BAA-2400^T),分离自健康成人的舌生物膜。

（李燕　肖丽英　肖晓蓉）

参考文献

1. 曹阳佩,周学东,施文元. 颗粒链球菌属的研究进展. 华西口腔医学杂志,2011,29:665-669
2. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, et al. The oral metagenome in health and disease. ISME J, 2012, 6: 46-56
3. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature, 2012, 486: 207-214
4. Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, et al. Study of inter-and intra-individual variations in the salivary microbiota. BMC Genomics, 2010, 11: 523
5. Lazarevic V, Whiteson K, Gaïa N, et al. Analysis of the salivary microbiome using culture-independent techniques. J Clin Bioinforma, 2012, 2: 4
6. Mahmoud A, Ghannoum, Richard J, et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. PLOS pathogens, 2010, 6: 1-8
7. Nasidze I, Li J, Quinque D, et al. Global diversity in the human salivary microbiome. Genome Res, 2009, 19: 636-643
8. Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al. The NIH Human Microbiome Project. Genome Research, 2009, 19: 2317-2323
9. Pride DT, Salzman J, Haynes M, et al. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. ISME J, 2012, 6: 915-926
10. Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? J Clin Periodontol, 2011, 38: 7-16

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



第五章 口腔微生态境中细菌黏附

细菌的黏附机制至今尚不完全清楚，主要的学说包括非特异性的静电学说、氢键结合、疏水作用和特异性的黏附素-受体学说。目前普遍认为非特异性黏附是细菌黏附的第一步，当菌体与介质表面接触且间距为 10 ~ 20nm 时，两者之间会产生排斥力，这时菌体利用静电、氢键和疏水作用等物理化学力来克服这种排斥力；当间距小于 1nm 时，菌体与介质表面就可产生较强的引力，从而菌体就有机会进行特异性黏附。

第一节　非特异性黏附

牙菌斑生物膜是龋病、牙周病的主要致病因子，始于细菌与牙齿表面唾液获得性膜以及细菌与细菌之间的相互黏附。黏附并不是菌细胞的简单堆积，而是一个具有高度组织性的复杂过程。

微生物的黏附可以分为四期：第一期细菌借助布朗运动，沉积或液体（唾液）流动到达牙面；第二期靠物体分子（粒子）间的引力（范德华力）、表面自由能、表面电荷等作用，也包含唾液覆盖牙面和细菌表面的疏水性使细菌附着牙齿表面；第三期是细菌借助本身产生的物质和由宿主来源的物质（如唾液中的蛋白）比较牢固地黏附于牙齿表面；第四期则是黏附细菌定植后的生长、繁殖直到形成牙菌斑生物膜。第一、二期是可逆的。

一、范德华引力与表面电荷

范德华引力是指在物质的聚集态中，分子间存在着的一种较弱的吸引力，作用能的大小一般只有每摩尔几千焦至几十千焦，比化学键的键能小 1 ~ 2 个数量级，它由三部分作用力组成：①当极性分子相互接近时，它们的固有偶极将同极相斥而异极相吸，定向排列，产生分子间的作用力，称为取向力。偶极矩越大，取向力越大。②当极性分子与非极性分子相互接近时，非极性分子在极性分子的固有偶极的作用下，发生极化，产生诱导偶极，然后诱导偶极与固有偶极相互吸引而产生分子间的作用力，称为诱导力。极性分子之间也存在诱导力。③非极性分子之间，由于组成分子的正、负微粒不断运动，产生瞬间正、负电荷重心不重合，而出现瞬时偶极。这种瞬时偶极之间的相互作用力称为色散力。分子量越大，色散力越大。当然，在极性分子与非极性分子之间或极性分子之间也存在着色散力。范德华引力是存在于分子间的一种不具有方向性和饱和性、作用范围在几百个皮米之间的力。细菌初期与物质表面的黏附就是吸引力-斥力平衡的结果。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

细菌、某些无机离子和宿主之间存在着静电作用，进入口腔内的菌群，由于范德华引力的作用，接近组织表面，细菌细胞壁的脂磷壁酸带有终末磷酸基团，磷酸基团（PO_4^{3-}）属于带负电荷的基团。牙齿表面有获得性膜附着，获得性膜内的糖蛋白含有磺酰集团和羧基，也带有负电荷。当细菌接近组织表面时，由于相同电荷的排斥，相互间保持几个纳米的间距，范德华引力就能有效地将细菌稳定在此区域。这是一种远距离作用的吸附力，此时的细菌与物质表面的距离>2nm。

物体表面的电荷对细菌的黏附也有重要的影响。Zeta 电荷由细菌表面离子键的数量和性质决定，Zeta 电荷越低，越不利于黏附。Weerkamp 等曾测量羟磷灰石与釉质在不同的固液比下的 zeta 电位（用 mV 表示），当固液比值低时，zeta 电位为负值。釉质的 zeta 电位经常比羟磷灰石低，用下颌下腺液处理釉质，固液比值高，zeta 电位变为正值。此时带正电荷的表面，有利于吸附带负电荷的唾液蛋白质分子，随后，带负电荷的革兰阳性细菌在 Ca^{2+} 的帮助下，就很容易与牙面的唾液获得性膜结合。

二、钙桥作用

钙桥作用是以电荷间的静电引力为依据解释细菌与上皮表面或牙齿表面之间的黏附现象。牙齿表面所覆盖的获得性膜主要是唾液糖蛋白，含有磺酰基团（$—SO_3^{2-}$）和羧基（—COOH—）；一些细菌胞壁上的脂磷壁酸（lipoteichoic acid，LTA）存在磷酸基团（$—PO_4^{3-}$），在口腔 pH 条件下糖蛋白和细菌均带负电荷，两者可通过唾液中含量丰富的钙离子（Ca^{2+}）结合，通过静电作用形成细菌-钙-糖蛋白和细菌-钙-细菌的结合，使细菌附着于牙面上。这个学说的主要实验依据是从变链菌株提取的脂磷壁酸对羟磷灰石有高度的亲和力，而用磷酸盐溶液可以解脱这种吸附。也有学者发现，在表兄链球菌菌液中加入钙可增加黏附，钙不仅影响蔗糖非依赖性黏附，而且影响蔗糖依赖性黏附。促进黏附的钙需求量均有阈值，超过阈值黏附量反而下降，提出 LTA-钙在黏附中的作用受钙浓度的制约，即对钙的需求有量的界限，这是对钙桥学说内容的一个补充。

三、氢键作用

氢键是一种分子间作用力，其本质是强极性键上的氢核与电负性很大的、含孤电子对并带有部分负电荷的原子之间的静电引力。氢原子可以同时与 2 个电负性很大、原子半径较小且带有未共享电子对的原子（如 O、N、F 等）相结合。氢键结合的情况如果写成通式，可用 X—H···Y 表示。式中 X 和 Y 代表 F、O、N 等电负性大而原子半径较小且带有未共享电子对的非金属原子。X 和 Y 可以是两种相同的元素，也可以是两种不同的元素。X-H 中，X 有极强的电负性，使得 X-H 键上的电子云密度偏向于 X 一端，而 H 显示部分正电荷；另一分子中的 Y 上也集中着电子云而显负性，与 H 以静电力相结合，这就是氢键的本质。

一般把形成氢键的静电引力也称为范德华力，所不同的是它具有饱和性与方向性。这种力一般在 40kJ/mol 以下，比范德华引力强，却比共价键小很多。氢键的作用有助于克服静电排斥力，这是一种近距离作用的吸附力，作用力的范围小于 2nm。氢键又可分为分子内氢键和分子间氢键，在细菌的黏附中发挥一定作用。获得性膜内的糖蛋白含有磺酰基团和羧基，细菌细胞壁上脂磷壁酸带有磷酸基团和羟基，细菌开始吸附于牙齿表面可由这些基因之间形成分子间氢键介导。对氢键在细菌黏附中作用的研究目前多采用光谱技术、原子力

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

显微技术、液相色谱技术、磁共振技术来研究。

四、疏水作用

疏水作用在细菌对牙面及口腔上皮细胞的初始黏附中起重要作用,其强弱与细菌表面疏水性密切相关。疏水性是指非极性溶液(溶质)在极性水中所呈现的不稳定状态,引起一系列热能和分子重新分布及排列的变化。细菌表面的疏水蛋白与获得性膜中的疏水基团结合,从而附着于牙齿表面,表面疏水性越强的细菌黏附力越强。

对变异链球菌细胞的疏水作用的研究发现变异链球菌细胞表面疏水性与其表面蛋白密切相关。疏水性细菌含有一些相对分子质量高达 190 000 的高分子蛋白,即表面蛋白抗原,这些高分子蛋白存在于细菌的细胞壁中,去除这些蛋白,则导致疏水性下降;用胰蛋白酶处理变异链球菌后,破坏了高分子蛋白,引起疏水性降低,也证实了其疏水性与表面蛋白密切相关。表面疏水性越强,则链球菌黏附到唾液获得性膜的比例越高,疏水性阻断剂(如四甲基尿素)能阻止链球菌对获得性膜的黏附,也表明细菌表面疏水性和黏附作用之间具有正相关关系。细菌表面疏水性与表面结构有关,疏水性的变化反映在细胞壁不同生化结构的改变上。采用磷酸异丁烯酰-磷酸聚乙醇处理羟磷灰石(hydroxyapatite,HA),磷酸异丁烯酰-磷酸聚乙醇明显抑制唾液蛋白和变异链球菌对 HA 的黏附,推测其增加了 HA 表面亲水性。聚二甲基硅氧烷具有极低的表面张力,可以黏附到固体表面,用其处理牙面后形成薄的坚硬的疏水性树脂层,抑制链球菌对牙面的黏附和生长。在人口腔中,疏水性菌株较亲水性菌株容易定居,它是近距离作用的有利于细菌黏附的力。

细菌初期在口腔表面的黏附是吸引力-斥力平衡的结果。细菌与材料表面的负电荷是产生静电斥力的原因,吸引力主要是范德华力、疏水力、特异性相互作用等。静电斥力使得细菌远离材料表面,范德华力的第二引力区(离表面约 15nm)能有效地将细菌稳定在该区域。疏水作用力范围离表面约 8~10nm,并且其强度比范德华力强 10~100 倍,它能有效地克服在范德华力的第一与第二引力区之间的斥力(离表面约 2~3nm),能使细菌进入第一引力区,从而使得细菌细胞膜表面受体与材料表面的配体发生特异性相互作用,造成较强的结合(尽管是非共价结合)。被结合细菌的分泌物又进一步形成生物膜,保护膜内细菌。

第二节　特异性黏附

口腔微生态是一个开放的生态境,浸没于持续的液体(即唾液)流动中,大量的微生物从进入口腔后就被唾液冲刷而被吞入消化道,只有那些能尽快与口腔中软硬组织面形成稳定连接的微生物才能定植于口腔中,而此时的微生物则主要借助于强力且不可逆的特异性黏附。

一、黏附素-受体学说

菌细胞之间或菌细胞与组织之间可通过互补性分子相互结合,这种结合是近距离、特异性的化学作用,是不可逆的过程。细菌表面的黏附分子称为黏附素(adhesin);特异识别黏附素并与之紧密结合的互补黏附分子称为受体(receptors)。不同细菌通过其特异性黏附素识别不同部位的受体,并与之结合,从而造就了口腔微生态环境中微生物组群的区域特异性。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

在细菌表面也可分布一些受体与其他细菌表面的黏附素相互作用、相互附着。

（一）受体

清洁干净的牙齿浸渍在唾液中会很快形成获得性膜，大约经历 90 ~ 120 分钟获得性膜中的受体分子达到饱和稳定状态。获得性膜中含有蛋白质、糖蛋白、脂类、脂多糖、氨基酸、溶菌酶、淀粉酶、清蛋白、免疫球蛋白以及一些细菌成分如葡糖基转移酶和葡聚糖等，这些成分都可作为细菌表面黏附素结合的受体。

口腔中不同部位获得性膜的名称和组成有所不同。附着在釉质表面的获得性膜称为釉质获得性膜，成分以唾液为主；附着在牙骨质表面的称为牙骨质获得性膜，成分以龈沟液为主；附着在黏膜表面的称为黏膜外衣（mucus coat），主要是混合唾液成分。在釉质获得性膜中，酸性富脯蛋白（acidic proline-rich proteins）和富酪蛋白（statherin）可促进一些细菌的黏附，如内氏放线菌、变异链球菌的部分菌株以及产黑色素厌氧菌（black-pigmented anaerobes）。

结缔组织中的重要组成部分胶原纤维，也可作为受体被某些链球菌如 *S. cricetis*，*S. ratti*、*Porphyromonas gingivalis* 识别和结合，链球菌或螺旋体可与纤连蛋白（fibronectin）表面的相应受体结合。

（二）黏附素

获得性膜形成后，很快便有细菌附着。口腔细菌可通过其菌体表面的黏附素与获得性膜表面的受体特异性结合，黏附素主要为菌体表面或附属器（如菌毛和纤毛）中的蛋白成分。同一种细菌可表达不同的黏附素分子，不同的细菌也可表达相同的黏附素分子。

菌毛（fimbriae）的直径大约 3 ~ 14nm，长度可达 20μm；而纤毛（fibrils）较为细小。具有菌毛的口腔细菌有内氏放线菌、牙龈卟啉单胞菌、唾液链球菌、副血链球菌和轻链球菌等细菌。纤毛可见于唾液链球菌、轻链球菌、中间普雷沃菌、变黑普氏菌（*P. nigrescens*）（图 5-1）和变异链球菌。



图 5-1　电镜观察下的普雷沃菌细胞表面的外周菌毛

注：图片摘自：Philip Marsh，Michael V. Martin，Michael A. O. Lewis. Oral Microbiology. Elsevier，2009

内氏放线菌具有 2 种不同类型的菌毛。Ⅰ型菌毛具有黏附素蛋白，可介导菌细胞与釉质获得性膜中的富脯蛋白和富酪蛋白结合；Ⅱ型菌毛可黏附于上皮细胞、多形核白细胞和口腔链球菌的糖苷（glycosidic）受体。

唾液链球菌（*S. salivarius*）具有 4 种长度不同的纤毛，分别为 63nm、73nm、91nm 以及 178nm。73nm 长的纤毛能够与颊黏膜细胞表面的受体结合，91nm 长的纤毛能够与小韦荣球菌（*Veillonella parvula*）结合，而 63nm 和 178nm 长的纤毛功能尚不明确。一些普雷沃菌株还具有外周纤毛（peritrichous fibrils）。

口腔链球菌的黏附涉及多种表面蛋白，如抗原多肽Ⅰ/Ⅱ。与黏附有关的一些细菌表面蛋白详见后文。

（三）黏附素-受体特异性结合

菌细胞表面存在着不同的黏附素，这些黏附素可与获得性膜上不同的受体特异性地结

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

合(图 5-2),因此细菌对表面的黏附素-受体结合的黏附模式也是各不相同的(表 5-1)。黏附竞争实验证实具有不同黏附素的细菌相互之间不会在唾液包被的羟基磷灰石表面竞争结合位点,如血链球菌与唾液链球菌之间、变异链球菌与表兄链球菌之间没有发现黏附竞争现象;但具有相同或相似黏附素的细菌之间就会出现竞争,如相同血清型的变异链球菌菌株之间就有黏附竞争。

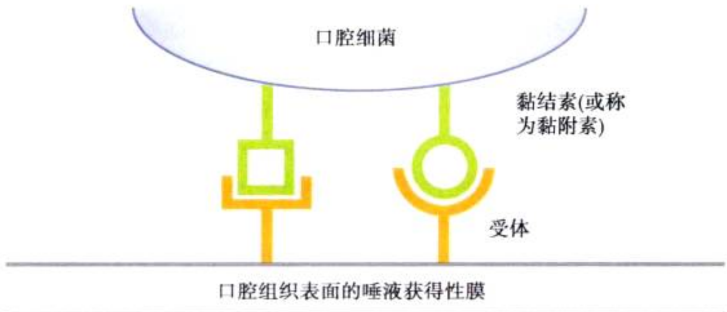


图 5-2 黏附素-受体模式图
注:图片摘自:AH Nobbs, RJ Lamont, HF Jenkinson. Streptococcus adherence and colonization. Microbiol Mol Biol Rev, 2009, 73(3):407-450

表 5-1 口腔主要细菌的黏附素与受体

细菌	黏附素	受体
血链球菌	结合唾液酸的蛋白	黏蛋白,其他
轻链球菌	结合唾液酸的蛋白	黏蛋白,淀粉酶,其他
变异链球菌	抗原 Ⅰ/Ⅱ,葡聚糖结合蛋白等	300kDa 黏蛋白,淀粉酶,富脯蛋白,半乳糖残基,葡聚糖
表兄链球菌	结合葡聚糖的蛋白,SpaA	葡聚糖
黏性放线菌	Ⅰ型菌毛,Ⅱ型菌毛	半乳糖残基,富脯蛋白,富酪蛋白
内氏放线菌	Ⅰ型菌毛	富脯蛋白
	Ⅱ型菌毛	半乳糖残基,链球菌
颊纤毛菌	结合半乳糖的蛋白	半乳糖残基,链球菌
具核梭杆菌	结合半乳糖的蛋白	半乳糖残基
	42kDa 蛋白	牙龈卟啉单胞菌
中间型拟杆菌	结合半乳糖的蛋白	半乳糖残基,胶原
牙龈卟啉单胞菌	菌毛,血细胞凝集素	富脯蛋白,精氨酸,多肽,胶原

口腔细菌黏附素与获得性膜受体之间相互作用的特异性也可以通过酶处理对细菌黏附的影响得到证实。用半乳糖氧化酶处理实验性唾液膜,可以明显减少变异链球菌的黏附量,不影响血链球菌和轻链球菌的黏附。伴刀豆球蛋白 A(concanavalin A)或麦芽凝集素处理实验性唾液膜,可减少变异链球菌的黏附,不影响黏性放线菌的黏附。神经氨酸酶(neuramidinase)处理实验性唾液膜,催化唾液酸水解,发现需结合唾液酸的血链球菌和轻链球菌的黏

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

附减少，但对变异链球菌的黏附无影响。

（四）黏附素-受体结合机制在牙菌斑生物膜形成过程中的意义

通过黏附素-受体作用机制直接黏附和定植到获得性膜上的口腔细菌通常称为早期定植菌，这些细菌在定植到牙齿表面的同时也为其他细菌提供了新的结合位点（受体），从而介导其他口腔细菌（后继定植菌）的定植，产生更新的结合位点（受体），进一步介导口腔中浮游细菌的定植，如此反复，不断演替，最终形成复杂、稳定的生物膜群落。

将具核梭杆菌（*Fusobacterium nucleatum*）与其他口腔细菌进行体外混合培养，具核梭杆菌能够与所有实验中的菌株发生共聚，并与后继定植的致病菌关系密切（图 5-3）。

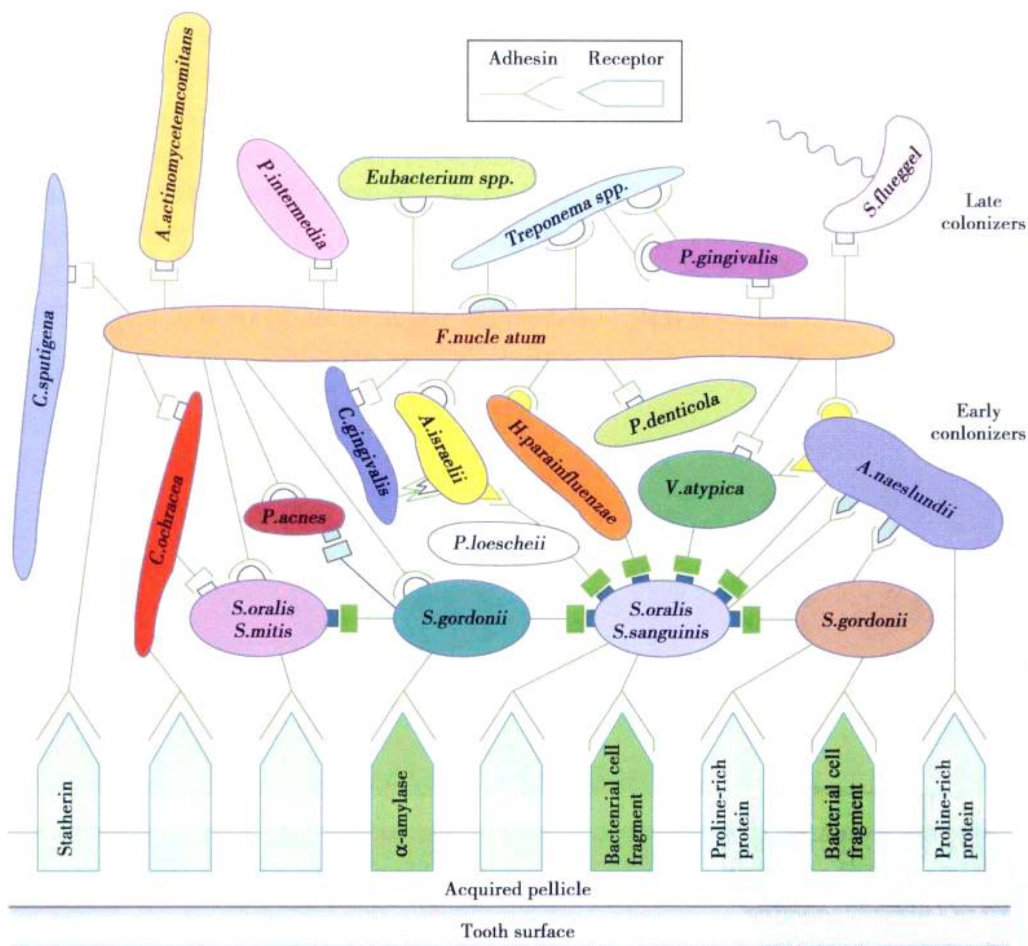


图 5-3　牙菌斑生物膜中不同菌种的黏附结构模式图

注：早期定植菌与牙面获得性膜中的受体特异性结合，其菌体表面结构可作为新的受体，介导后继定植菌的附着。该图片摘自：Philip Marsh，Michael V Martin，Michael A O Lewis. *Oral Microbiology*. Elsevier，2009

一种细菌表面可能存在多种受体，同一种受体也可能出现在不同菌种的表面。由于这种共同受体的存在，牙菌斑生物膜可随共聚菌种的变化向不同方向发展，进而赋予了生物膜

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

中微生物的多样性及复杂性。

不同细菌对牙面特异性的黏附以及彼此之间特异性的共聚，是牙菌斑生物膜形成与成熟的基本前提。缺乏对获得性膜定植能力的细菌可通过与其他细菌的黏附和共聚作用而间接定植到牙齿表面。黏附和共聚在使微生物按顺序附着至牙面的同时，也使牙菌斑生物膜中不同种属微生物有序地分布，从而形成复杂有序的三维立体结构。

二、脂磷壁酸-葡聚糖-葡糖基转移酶复合体作用

脂磷壁酸（Lipoteichoic acid，简称 LTA）为革兰阳性菌细胞壁和细胞膜的成分，是含磷非核酸物质。在化学结构上，LTA 是由核糖醇或甘油残基经磷酸二酯键互相连接而成的多聚物，以多个磷酸分子组成长链的形式穿插于肽聚糖层中，一端（亲脂基团）通过糖脂与膜外层糖脂共价联结，另一端则穿越肽聚糖层呈游离状态（亲水基团），通过 D-丙氨酸这一关键位点发挥黏附机体细胞和免疫刺激作用。LTA 是革兰阳性菌的重要表面抗原，在调节离子通过黏液层及细菌黏附过程中起作用，也可能与某些酶的活性有关。葡聚糖是由口腔链球菌的一种胞外酶——葡萄糖基转移酶（glucosyltransferase，简称 GTF）催化蔗糖产生的一种多糖。葡聚糖在生物膜形成和口腔链球菌致龋过程中起着关键作用，其存在于牙面或唾液中往往形成高度不可溶解的膜状物，而且具有与微生物的结合位点，有利于微生物附着（图 5-4），又可与多种蛋白结合形成复合体，口腔链球菌对牙齿表面的初始黏附取决于这些葡聚糖

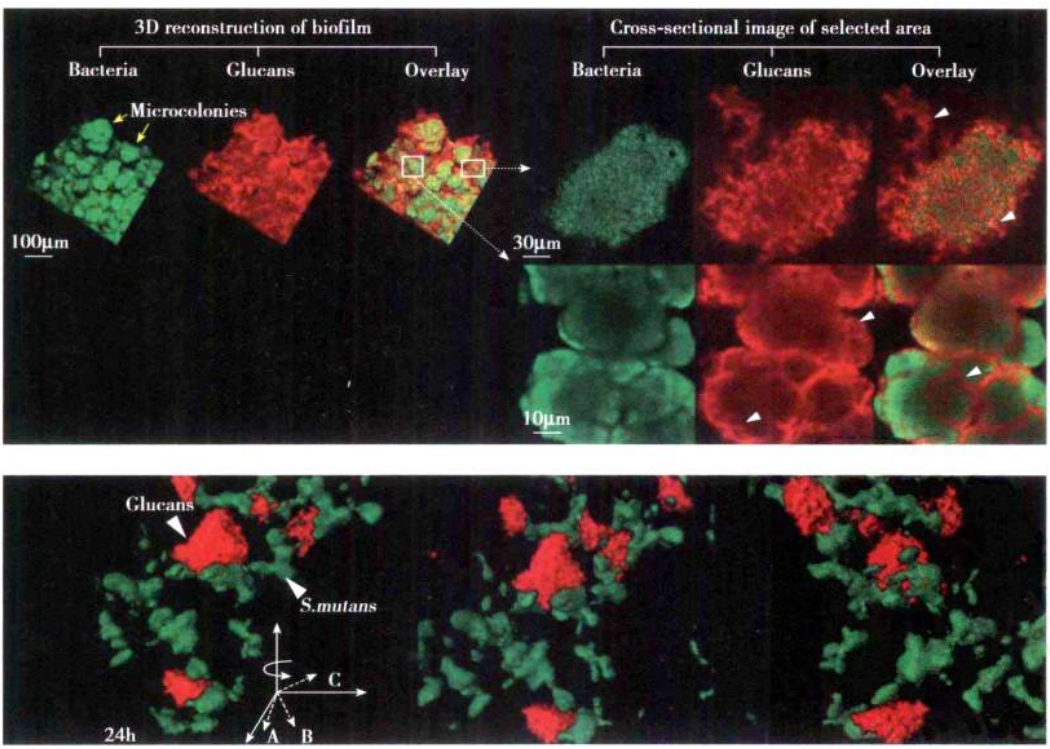


图 5-4 1%蔗糖溶液中釉质表面变异链球菌（*S. mutans*）US 159 生物膜内细菌与葡聚糖的关系

注：绿色为变异链球菌，红色为葡聚糖。图片摘自：W. H. Bowen, et al. Caries Research, 2011, 45: 69-86

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

结合蛋白(glucan-binding proteins,简称 Gbps)。

(一) 脂磷壁酸-葡聚糖-葡糖基转移酶复合体黏附

Rolla 等通过对人和猴的实验发现,给蔗糖组牙菌斑生物膜中葡聚糖量多,LTA 量也多;给葡萄糖组牙菌斑生物膜中葡聚糖量少,LTA 量也少。在培养基中添加蔗糖,变异链球菌菌株产生葡聚糖和 LTA,两者不能通过排阻色谱法分离。唾液中,还有某些细菌如血链球菌,存在一种可以结合葡聚糖的活性因子 LTA;同时,研究支持 LTA 既可以与微生物来源的蛋白质形成复合体,也可以构成牙菌斑成分。在这些研究中均发现 LTA 与葡聚糖有很强的相关性,推测这两种物质是以复合体的形式存在。葡聚糖溶液在固体表面的黏附仅为中等强度,将预先合成好的葡聚糖加入体外黏结系统中并不促进细菌的黏附,将葡聚糖和对其起催化作用的 GTF 加入共同培养时,则可显著促进细菌的黏附。因此,GTF 不仅起催化作用,也与葡聚糖一起直接参与细菌的黏附过程。

Hamada 研究发现,提纯的 GTF 制剂总是被少量的 LTA 所污染,他认为这种污染系由于 LTA 和 GTF 的紧密结合,LTA 和 GTF 均有葡聚糖受体,这些受体将三者结合成复合体,在细菌的黏附过程中起作用。于是学者们提出了脂磷壁酸-葡聚糖-葡糖基转移酶复合体学说:葡聚糖在中间起桥梁作用,可连接 LTA 与 GTF 结合,并形成复合体,在口腔细菌黏附过程中发挥作用,促使牙菌斑生物膜形成。

(二) 脂磷壁酸与葡聚糖在细菌黏附中的作用

LTA 为革兰阳性细菌细胞壁结构的一部分,在细菌的致病性中起着重要作用,与细菌的黏附和逃避宿主的免疫监视相关。LTA 能被宿主表面特殊的信号分子 Toll-like receptor 识别,其有一端是突出细菌表面游离于环境中,被认为与 LTA 附着宿主表面能力相关。

LTA 还具有抗静电斥力的能力,酿脓链球菌(*S. pyogenes*)与宿主的吸附过程可能涉及 LTA 的静电吸附作用。链球菌与宿主的结合过程包括 2 个阶段:首先,LTA 与宿主细胞表面的蛋白结合区域的疏水作用;其次则是涉及一些蛋白依赖受体作用的吸附,如 M 蛋白、Fn 结合蛋白等。LTA 能与 M 蛋白形成可溶于乙醇的复合物,M 蛋白的疏水区域能稳固地连接于 LTA 和带电的氨基酸侧链上。但目前对 LTA 具体的黏附机制尚不清楚。

LTA 能脱离细胞壁,释放到周围环境中,从而形成游离的 LTA。LTA 本身具有较强的葡聚糖结合能力,少量的 LTA 能结合大量的葡聚糖形成复合物。蔗糖的存在能促进口腔链球菌的附着能力,被认为是口腔链球菌释放少量 LTA 与蔗糖代谢产物葡聚糖相结合,促进细菌的黏附。

链球菌的表面可能是疏水的,而唾液蛋白也具有疏水的区域,同样唾液蛋白内也含有糖脂类,这些疏水的组成部分为稳固葡聚糖-LTA 复合物提供适宜的环境,利于牙菌斑生物膜的形成。LTA 特异性地存在于人牙菌斑生物膜中,并对于维护其完整性发挥重要作用,在与葡聚糖结合及发生结合反应的能力上,不同链球菌 LTA 的生物学能力基本相似。在体内,来自于口腔革兰阳性菌产生的游离 LTA 极有可能对已形成牙菌斑生物膜的附着产生影响,口腔细菌是否与非水溶性的葡聚糖结合及蔗糖和 LTA 是怎样影响这些吸附过程仍有待验证。戈氏链球菌(*S. gordonii*)细胞与链球菌性的葡聚糖可以发生相互作用,葡聚糖的浓度及细菌的可供利用的结合位点对于细菌的黏附具有重要影响。

(三) 葡糖基转移酶与葡聚糖在细菌黏附中的作用

葡糖基转移酶(GTF)是细菌致龋的重要毒力因子之一,GTF 作为变异链球菌合成的固

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

有酶,可特异性以蔗糖为底物合成细胞外葡聚糖,这些高分子多糖具有促进细菌附着至牙面及细菌间选择性黏附的功能,增强致龋作用。变异链球菌与葡聚糖的结合是通过 GTF 和葡聚糖结合蛋白(Gbp)介导,当葡聚糖与 GTF 结合时,变异链球菌黏附能力可以提高 3 倍。目前为止,已知的变异链球菌存在 4 种葡聚糖结合蛋白,分别为 GbpA、GbpB、GbpC、GbpD,其中 GbpD 在血链球菌中能够与 LTA 结合并释放游离的脂肪酸;GbpA 和 GbpD 包含的羧基末端重复类似于葡聚糖与 GTF 结合位点的羧基末端重复;GbpB 是一种类似于肽聚糖水解酶的蛋白;GbpC 还未被鉴定,但它与抗原Ⅰ/Ⅱ家族多肽具有同源性;GbpC 或者 GbpB 可能是细胞壁中细胞表面葡聚糖受体,所有的葡聚糖结合蛋白在蔗糖依赖性黏附和生物膜的形成中都起着重要的作用。实际上,只要牙菌斑生物膜中有蔗糖存在,GTF 将持续利用蔗糖形成葡聚糖和果糖,GTF 和葡聚糖可能通过提供葡聚糖结合蛋白的结合位点直接影响变异链球菌初始黏附。

通过原子能显微镜分析,变异链球菌黏附于牙面主要由葡聚糖介导。研究表明,GTF 可以活性形式吸附进入获得性膜,所产生的葡聚糖可为细菌提供结合位点,促进口腔链球菌对牙齿表面初始黏附,葡聚糖是吸附于口腔微生物表面而不是直接附着于牙齿表面。变异链球菌至少产生 3 种葡糖基转移酶 GTF-I、GTF-IS 和 GTF-S,其编码基因分别为 *gtfB*、*gtfC*、*gtfD*,少数还有 *gtfA* 基因。其中 GTF-I 主要合成非水溶性葡聚糖,具有很强的黏性,在细菌黏附过程中起重要作用;GTF-IS 既合成非水溶性葡聚糖,又合成水溶性葡聚糖;GTF-S 主要合成水溶性葡聚糖,由于其较溶于水,故致龋作用相对较低。部分 GTF-S 合成的水溶性葡聚糖还被 GTF-I、GTF-IS 用来进一步合成非水溶性多糖,三者存在一定的协同性作用。研究发现

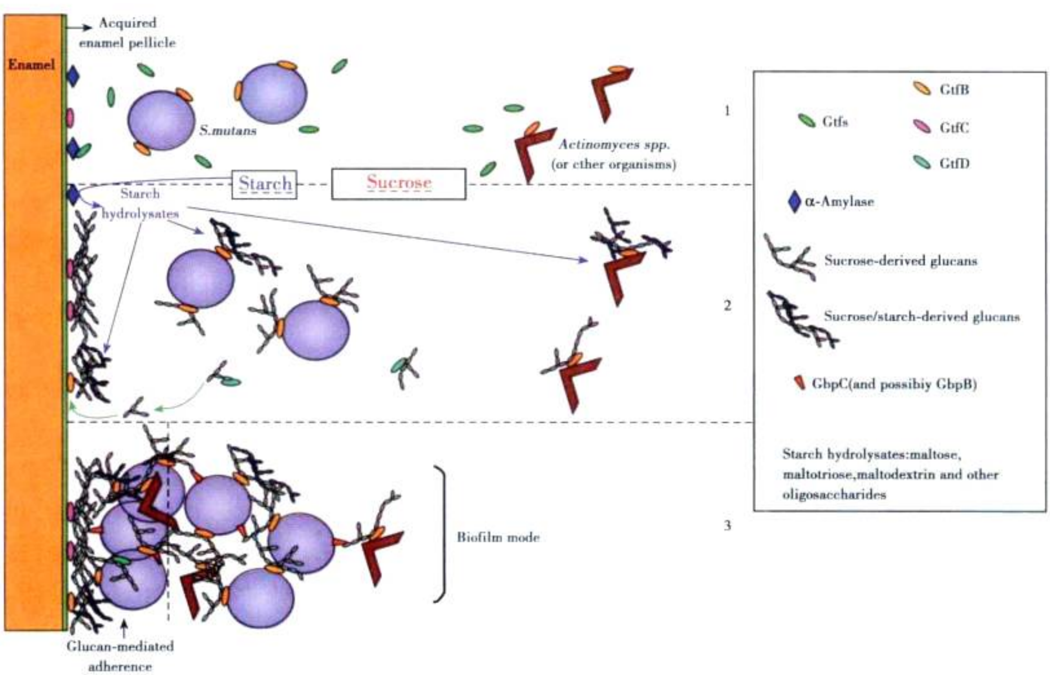


图 5-5 GTF-葡聚糖介导的细菌黏附和致龋生物膜的发展示意图

注:图片摘自:W. H. Bowen, et al. Caries Research, 2011, 45:69-86

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

spap 和 *gtf* 基因缺陷变异链球菌在牙齿表面的黏附能力明显下降。

人唾液中存在的 GTF 既能吸附至获得性膜上，又可存在于细菌细胞表面，唾液对 GTF 分子的转移起着载体的作用。游离的 GTF 可以转移吸附到细菌细胞和牙体表面，使细菌获得或增强合成葡聚糖的能力，这些葡聚糖链结合的 GTF 在细菌表面和牙面之间相互作用并形成强有力的结合，形成牙菌斑生物膜，并不断发展成熟(图 5-5)。葡糖基转移酶不仅可以利用蔗糖形成葡聚糖，还可以为口腔微生物提供牙面定植位点及形成非水溶性的牙菌斑基质。牙菌斑生物膜中的 GTF 由于其保持的酶活性，可以在原位合成葡聚糖并与之结合，为其他口腔微生物提供了更多的结合位点黏附于牙菌斑生物膜。通过 GTF 合成的葡聚糖堆积是形成生物膜基质的必要因素，基质可以增强细菌细胞的吸附能力并形成高度致密的微生物菌落。

脂磷壁酸-葡聚糖-葡糖基转移酶复合体的黏附具体机制尚未明确，该复合体的存在得到了许多文献的支持，其在革兰阳性菌特异性黏附中起着不可忽视的作用。

第三节 黏附过程与影响因素

细菌在口腔不同组织中的黏附是其生存的首要条件。口腔微生态境是一个开放系统，像河流一样，始终有以唾液为主的流动液体冲洗掉未黏附到口腔组织上的细菌。很多微生物一旦进入口腔就被唾液包围，但是一些细菌由于在激烈的竞争条件下没有合适的生长环境而不能繁殖，只能在口腔软硬组织上作短暂的停留。这些微生物是口腔暂时定居者或外来者，但对微生物群落的构成和功能也可能起着一定的作用。而在口腔中定植的菌群是特定黏附到口腔组织中并能充分利用营养资源的一类微生物。

一、细菌初始黏附

由于口腔环境的不同，初始的定居者仅有一小部分细菌，并为后来其他细菌的黏附提供新的受体，继而一些其他的细菌则黏附到这些初始定居者之上。最初黏附到牙面的是球菌，主要是血链球菌，继而其他不同的细菌以不同的速率黏附其上(如梭杆菌属)。

唾液中的浮游微生物通过紧密黏附于口腔各种组织面上得以在口腔流动环境中生存，其中涉及多种因素。当唾液流动性高时，对流运动增强细菌在液体与固体界面的聚集，口腔中固体组织的摩擦力促进细菌的黏附(尤其是义齿的粗糙程度)。当唾液流动性较低时，分子的布朗运动减慢，利于悬浮细菌聚集黏附到组织面上，例如螺旋菌属以趋化性能动反应黏附；口腔链球菌是生物膜形成的早期定植菌，富含 α-淀粉酶、富脯蛋白、糖蛋白，能选择性特异性地黏附到牙齿表面，如血链球菌、口腔链球菌和表兄链球菌等，其黏附涉及静电学和流体动力学的相互作用、热力学参数和黏附受体等。值得一提的是，细菌-细菌之间的黏附在复杂的交互网络构建和口腔生物膜微生态构成中起着非常重要的作用，促进微生物(如致龋菌变异链球菌和牙周致病菌)的后期黏附，导致龋病、牙龈和牙周组织的炎症。

微生物暂定到牙齿表面，需要避免被取代和排除。有意思的是，细菌表面带有惰性负电荷的粒子，宿主也带有相似的惰性负电荷，两个同种极性实体间的反应可被 DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek)能量反应系统测定。两个带负电荷的物体靠在一起会相互排斥，但这种排斥现象又会被黏附组织表面上单个分子偶极内部的波动消除。但如果

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

两种同种极性物体表面靠得太近，由于电子层的重叠将会形成强烈的排斥力。DLVO 理论为细菌的初始黏附提供了一种理论诠释，但不能全面地阐述细菌黏附的复杂过程，尚有其他因素参与细菌的早期黏附过程，如通过唾液中二价阳离子（Ca^{2+}）的桥接吻合、分子的非极性区和氢键之间的疏水作用等，这些因素在细菌和获得性膜之间及细菌的黏附周期间产生了一些协调关系。

为了保持更为长期稳定的黏附，细菌需要通过自身特有的细胞表面分子构建更为高度亲和的黏附结构，如与抗原抗体反应相似的交互立体化学的同源受体反应。细菌共有的一些结构（如细菌的菌毛和纤维素）可延伸到菌体若干微米外而保持与宿主在最佳的黏附距离，通过受体蛋白-碳水化合物之间（凝集素样）或蛋白-蛋白之间作用调节强烈而不可逆的短期黏附。

微生物对不同组织表面的特异性结合是大多数细菌选择性黏附的基础，其黏附过程大致可分为 4 个阶段：①向基质表面移动；②初期黏附；③附着阶段；④定植阶段。口腔微生物具有的特定黏附性能给予细菌黏附过程的特异性，这是一些细菌特异性趋向性黏附的基础。例如，血链球菌主要特异性黏附到牙齿表面，唾液链球菌特异黏附到舌体背部。细菌本身具有的一些协同作用亦可能是细菌特异黏附的需要，如细菌蛋白酶的作用使得宿主细胞受体的部分酶解，从而暴露一些黏性区域利于黏附；反之，没有细菌蛋白酶的辅助下，这些黏性区域隐藏于宿主细胞分子内部而致细菌不能黏附或黏附力下降。

二、细菌共黏附

悬浮状态下不同细菌之间的相互作用称作是细菌“共聚”。发生于悬浮细菌生物膜状态间细菌间的相互作用称为“共黏附”。体外实验已经证实有超过 1000 对的细菌可相互共聚，如韦荣菌可黏附到黏性放线菌，产黑色素类杆菌能黏附到放线菌和链球菌上，链球菌属和放线菌属可黏附到黏性放线菌、内氏放线菌、丙酸杆菌及革兰阴性的拟杆菌、二氧化碳嗜纤维菌、具核梭杆菌等上，而具核梭杆菌又可黏附到产黑色素类杆菌上，从而形成较为复杂的口腔微生态系统。在大多数情况下，细菌共黏附涉及共聚细菌间碳水化合物的结构，像识别凝集素样黏附蛋白、胞外多糖样受体等。

以变异链球菌为例，初期时在细菌细胞壁蛋白与获得性膜的唾液糖蛋白之间产生微弱的吸附。随着口腔摄入糖量的增加（特别是蔗糖），一些细菌利用蔗糖合成胞外多糖，特别是葡聚糖诱导细菌细胞同宿主细胞表面受体以配位形式结合而形成的不可逆性附着。口腔链球菌的选择性附着开始是非特异性、低亲和力、非常迅速的结合反应，继之才是特异性、高亲和力、缓慢却是对获得性膜强有力的附着（图 5-6）。

环境因素也可影响细菌的黏附，如 pH 值、温度、氧气浓度、有机物代谢等，也可由细菌细胞壁的脂磷壁酸、钙离子和酸性唾液蛋白的静电作用等。细菌表面蛋白和分泌蛋白是细菌黏附的调节者，转运蛋白是细菌营养和信号分子转导的中心，双组分信号转导系统又加强了环境、宿主和细菌的反应。所有这些表面成分都有助于细菌的定植及生物膜的形成和微生物生态群体的构建。

口腔微生物的黏附过程比较复杂，不仅涉及细菌与细菌间、细菌与宿主间的特定选择性的配位受体识别系统，还与一些信号分子的转导（密度感应信号、二级信使环鸟苷二磷酸等）密切相关。因此，全面系统地认识细菌的黏附过程可为口腔疾病病因学研究提供新的理论

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

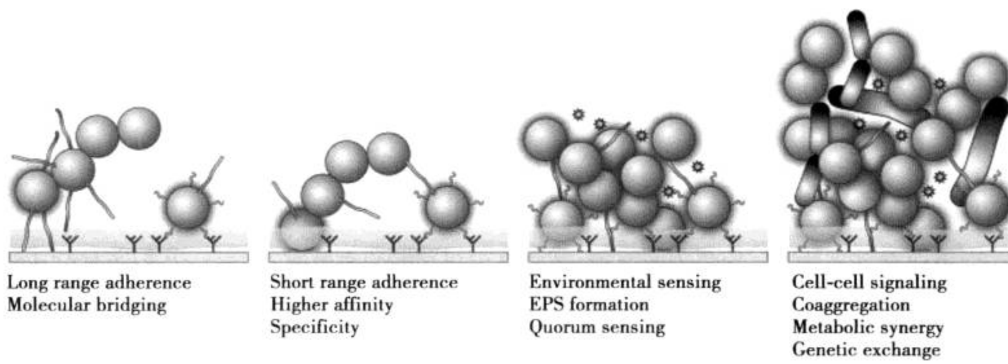


图 5-6　链球菌属黏附的过程

注：A. 初始定植者的黏附，菌毛可穿透黏液而实现远程黏附；B. 初始定植者构成更强有力黏附；C. 营养物质的改变，细菌的群居；D. 同属或不同属间微生物的黏附，形成更为复杂的微生物群体——生物膜。该图片摘自：Nobbs A. H. ,2009

依据，进一步深入探索细菌的黏附机制可为口腔疾病的防治提供新的视角。

三、口腔生物膜形成过程

细菌一般以生物膜的形式存在，细菌黏附的最终目的也是形成生物膜这样一个稳定的生态定植形式。牙菌斑生物膜作为一种典型的生物膜结构，其形成并不是细菌随机的结合，而是具有相对特殊的连续性，其形成大致可经历 4 个阶段（图 5-7）：①浮游阶段：微生物尚未附着在载体表面；②附着阶段：包括细菌通过静电作用可逆性吸附至牙面和不可逆性附着；③初始微菌落阶段：微生物菌群不断地共聚和黏附形成的小菌群；④生物膜成熟和散播阶段：微菌落不断聚集融合形成大的菌落而呈典型的蘑菇样突起，细菌与细菌间的集合形成共聚体，最后形成极为复杂的微生物菌群，成熟大菌落中的微生物又可脱离母体而散播形成游离的悬浮态，从而开始新的附着和循环。

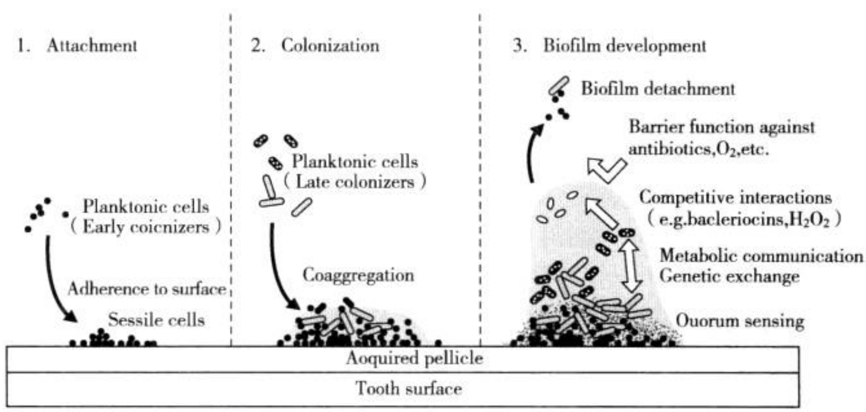


图 5-7　牙菌斑生物膜形成过程示意图

注：图片摘自：K. Hojo, S. Nagaoka, T. Ohshima, et al. Bacterial interactions in dental biofilm development. J Dent Res, 2009, 88: 982

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

早期定植菌在唾液获得性膜形成早期黏附,共聚作用促进了后续细菌的进一步黏附,促成了生物膜多样性的丰富与成熟,并为生物膜内层的菌细胞提供了保护屏障。

四、与黏附相关的宿主因子(受体)

病原菌与口腔组织的附着是绝大多数病原菌感染过程中的第一步。细菌对口腔组织的附着具有高度特异性。变异链球菌和血链球菌对牙体硬组织表面最具亲和力,唾液链球菌则多黏附于舌背和黏膜上皮。

细菌体表特异性配位体称为附着器,常具有类植物凝集素或疏水特性,它们常存在于细菌表面的丝状结构,如菌毛。而牙齿或黏膜表面与细菌附着器发生作用的分子称为受体。

(一) 黏膜上皮细胞与黏附

人类口腔唾液中含有大量的蛋白质,唾液的蛋白质和糖蛋白被吸收到口腔软硬组织表面形成获得性膜。获得性膜内蛋白,如富脯蛋白与颊上皮细胞的共价连接,提供了很多潜在的微生物黏附的受体。但除此之外,宿主黏膜上皮细胞表面也具有黏附素受体,一般是糖蛋白或糖脂,起着桥梁分子的作用,介导细菌对组织和细胞的黏附。

病原菌黏附素与黏膜上皮细胞表面受体的相互作用具有高度特异性,一种病原菌可具备多种黏附素。大多数革兰阴性细菌的黏附受体是糖蛋白或糖脂,其受体特异性部位往往是其中的糖类残基。革兰阳性菌表面黏附的特异受体往往是人和动物组织中存在的细胞外基质的一些成分,其中以纤维结合素、胶原、纤维蛋白原(fibrinogen,Fg)居多。

白假丝酵母菌是口腔最常见的一类念珠菌,念珠菌黏附于宿主上皮的能力是其在宿主中形成集落及入侵体内的第一步。白假丝酵母菌可以与不同的细胞基质蛋白结合,如纤维粘连蛋白、层粘连蛋白及胶原等。口腔黏膜上皮细胞与白假丝酵母菌作用的基质蛋白主要是纤维粘连蛋白,它属于高分子量糖蛋白。

纤维蛋白原即凝血因子,是血浆中含量最丰富的蛋白质之一,原核细胞和真核细胞均可与之结合。Fg 可由牙龈上皮细胞和成纤维细胞等合成,并与纤维黏连蛋白、层黏连蛋白、透明质酸等协同构成细胞外基质。有学者认为 Fg 可以作为细菌定植的支持性基质。Fg 以二聚体形式存在,每个 Fg 分子可结合多个菌细胞,为细菌间的相互集聚提供了媒介。牙龈卟啉单胞菌是牙周病的主要致病菌,对上皮细胞的黏附是其致病先提条件。研究发现,Pg 菌毛可与 Fg 特异、高亲和性地结合,对其侵入牙周组织,进而造成感染至关重要。除 Pg 外,福赛拟杆菌、中间普雷沃菌、齿垢密螺旋体等牙周致病菌均具有结合并降解 Fg 的能力(图 5-8),且每个菌细胞具有数百到上千个不等的 Fg 结合位点。这些特点使牙周致病菌可通过黏附在覆以 Fg 的黏膜上皮细胞表面,从而定植于宿主组织。

(二) 唾液获得性膜受体与黏附

唾液的主要成分来自于三大主要的唾液腺:腮腺、下颌下腺、舌下腺。来自于三大唾液腺分泌液的蛋白成分有:富脯蛋白(酸性、碱性、糖基化家族)、淀粉酶、富酪蛋白、富组蛋白、溶菌酶、乳铁蛋白、乳过氧化物酶和分泌型的免疫球蛋白 A,而胱蛋白和黏蛋白存在于下颌下腺和舌下腺液。

获得性薄膜是唾液中的前体蛋白选择性地吸附牙齿表面的一层薄膜,含有氨基酸、蛋白质、碳水化合物和脂类等物质(图 5-9)。在保持牙齿结构的完整性方面起着重要的作用。作为牙齿和口腔环境之间的界面,获得性膜形成后,细菌立即黏附在上面而形成牙菌斑。细菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

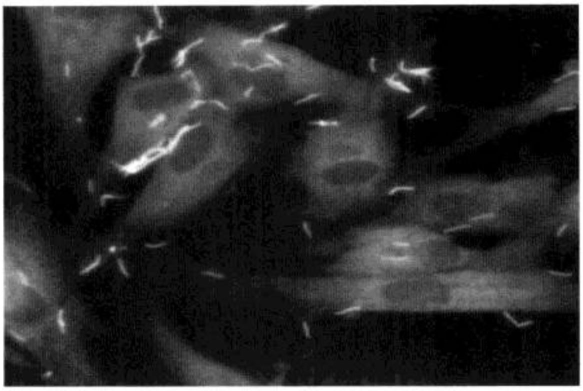


图 5-8　齿垢密螺旋体与牙周膜细胞培养 2 小时，可见两者的结合及纤维蛋白原的降解

注：图片摘自：Fenno JC. Treponema denticola interactions with host proteins. J Oral Microbiol，2012；4. doi：10.3402/jom. v4i0. 9929

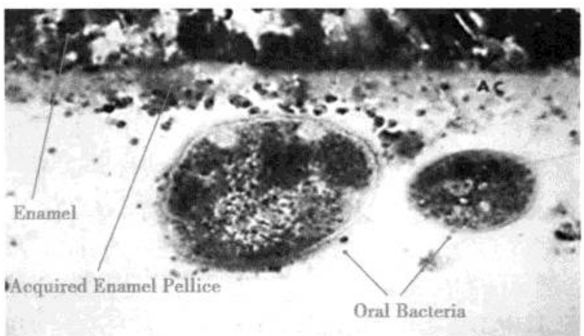


图 5-9　获得性薄膜是唾液中的蛋白选择性地吸附牙齿表面的一层薄膜

注：图片摘自：http://www.dentist-charlotte-north-carolina-nc.com/enamel-and-decay.html

对牙面的黏附实质是细菌表面黏附素与获得性膜内特异性蛋白受体发生特异性结合而介导细菌定居。

唾液蛋白作为唾液获得性膜中最主要的有机组分，在口腔细菌黏附和定植中发挥了不同的作用。正常状态下，多种唾液蛋白可协同作用，既作为口腔细菌受体，又能够抑制细菌的黏附、聚集；一旦因病理或外源性因素使唾液蛋白的平衡或协同作用遭受破坏或抑制，唾液蛋白的细胞受体作用将会促使细菌吸附至牙齿表面形成牙菌斑生物膜。

（三）唾液中与细菌黏附有关的几类重要蛋白质

1. 糖蛋白和黏蛋白　糖蛋白（glycoproteins）是由蛋白质和碳水化合物组成的共价复合物，其辅基部分是复合多糖，由己糖（半乳糖或甘露糖）、氨基己糖（氨基葡萄糖或氨基半乳糖）、甲基戊糖（岩藻糖）和唾液酸（N-乙酰神经氨酸）组成。许多唾液蛋白质如富脯蛋白、富组蛋白、淀粉酶、乳铁蛋白（lactoferrin，LF）均属于糖蛋白。一些糖蛋白可以结合到牙齿表

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

面，作为基质构成获得性膜，是形成菌斑生物膜的细菌黏附素受体。

获得性膜表面糖蛋白结构中的唾液酸是福赛斯坦纳菌（*Tannerella forsythia*，Tf）的重要黏附分子，Tf 表达的唾液酸酶活性是其利用唾液酸黏附于生物膜的关键，在 Tf 最初黏附与生物膜生长过程中扮演了重要角色。当糖蛋白中唾液酸缺失时，糖蛋白所含氨基葡萄糖或氨基半乳糖则成为 Tf 关键的黏附分子，此时 Tf 氨基己糖苷酶活性的表达在糖蛋白覆盖牙面的生物膜生长中起重要作用。糖蛋白对细菌在羟基磷灰石（hydroxyapatite，HA）上的黏附作用受到环境中 pH 的影响，在龋病活跃阶段，致龋菌利用糖产酸增加，引起 pH 降低，可导致糖蛋白介导的细菌的黏附力增加。

根据分泌物的来源，可将糖蛋白分为两类，即浆液性糖蛋白（serous glycoproteins）和黏液性糖蛋白（mucous glycoproteins），后者又称为黏蛋白。与黏蛋白相比，浆液性糖蛋白含大量的甘露糖，且分子量较低。黏蛋白分子量较高，甘露糖含量可忽略不计。

人唾液黏蛋白主要有 2 种类型：高相对分子质量唾液黏蛋白（MG1）和低相对分子质量唾液黏蛋白（MG2），对口腔微生物的定植与黏附有着不同的作用。MG1 含亚硫酸盐较多，对 HA 亲和力大，是牙齿初期获得性膜的组成成分，可作为主体形式接受口腔细菌的选择性附着，与多个种属的口腔链球菌相互作用，调节链球菌群在口腔组织的定植。MG2 对牙面的亲和力不高，但其独特的功能在于其内含大量的神经氨酸，能与一些细菌发生特异性作用，如能与血链球菌和轻链菌结合，促进细菌凝集成团，这种相互作用将有助于非免疫性从口腔中清除这些细菌，减少细菌附着至牙齿或黏膜表面，调节口腔微生物群。

2. 富脯蛋白、富酪蛋白与富组蛋白　富脯蛋白是一组结构相似的含磷蛋白，其特点是氨基酸组成中脯氨酸含量很高，可达 25% ~40%，可分为酸性富脯蛋白（APRPs）、碱性富脯蛋白（BPRPs）和糖性富脯蛋白（GPRPs）。APRPs 具有与胶原 α-链结构相似的初级结构，对 HA 有高度的亲和力，能参与获得性膜形成，构成口腔微生物的黏附素受体。如 APRPs 和富酪蛋白（Statherin，富含脯氨酸和酪氨酸的磷蛋白）能明显促进黏性放线菌对 HA 的黏附。黏放菌有 Ⅰ、Ⅱ 两型菌毛，其中 Ⅰ 型菌毛不含碳水化合物，已被证实是黏放菌与获得性膜受体结合的主要表面结构。FimQ 是 Ⅰ 型菌毛的主要黏附素，并能促进菌毛的装配。Ⅰ 型菌毛只能识别附着于 HA 表面的 PRPs，即隐蔽受体。BPRPs、GPRPs 也能与黏放菌 Ⅰ 型菌毛发生特异性结合，而 APRPs、GPRPs 还是变异链球菌表面黏附素的一种受体分子，通过与变链菌的相互作用调节唾液中变链菌的数量，同时也影响牙菌斑生物膜中微生物组成。

唾液富组蛋白（histidine-rich proteins，HRPs）是一族富含组氨酸且氨基酸序列相似的阳离子同源多肽，被认为是口腔非免疫防御系统的重要组成成分。HRPs 可参与获得性膜的形成，并作为部分口腔微生物的黏附受体促进微生物的定植与黏附。但同时，HRPs 具有抑菌活性，如抑制变异链球菌的生长繁殖，从而减少细菌在牙面的定植与吸附。

3. 淀粉酶　淀粉酶是唾液中最早发现的酶，主要由唾液腺浆液性腺泡产生。按淀粉酶分解产物的旋光性可分为 α-淀粉酶和 β-淀粉酶，唾液淀粉酶属 α-淀粉酶。α-淀粉酶可参与获得性膜的形成，选择性地与多种口腔链球菌结合，在菌斑形成过程中发挥重要作用。目前研究表明，α-淀粉酶可以促进部分细菌同时又抑制另一部分细菌对 HA 的黏附。如 α-淀粉酶促进血链球菌黏附，其机制可能是当它与 HA 表面 Ca^{2+} 键合时，结构发生了改变，原来某些隐藏的具有与细菌黏附素作用的子片段即隐蔽受体得以暴露，从而促进黏附。而其抑制变异链球菌黏附的机制可能与其表面缺乏变异链球菌附着的受体有关；同时，α-淀粉酶与变

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

异链球菌对 HA 的黏附存在着相互竞争的可能性。

4. 抗菌蛋白 抗菌蛋白是唾液中一类具有抗菌作用的蛋白质，其共性是可通过其抑菌、杀菌作用减少细菌数量，间接减少细菌对牙面或充填体、修复体及黏膜表面的吸附。抗菌蛋白可分为免疫球蛋白类和非免疫球蛋白类，而非免疫球蛋白又包括溶菌酶（lysozyme，LZ）、乳铁蛋白（LF）、凝集素、过氧化物酶-硫氰酸盐抗菌系统等。

溶菌酶是唾液中的最重要的抗菌成分之一，是宿主口腔先天性防御系统的关键组分，它可以通过数种机制阻碍细菌在牙面附着：①攻击细菌表面结合位点；②作用于受体，调节细菌附着；③改变 HA 的唾液包被上的结合位点；④非选择性地覆盖 HA 的表面而阻碍黏附。

LZ 还是一种水解酶，能水解细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰细胞壁酸与 N-乙酰葡糖胺之间的 β-1，4 糖苷键，使细胞膜变脆易于破裂而杀灭细菌，减少细菌吸附。虽然在体内和体外实验中均表明溶菌酶可以明显地抑制致龋菌的生长、黏附，唾液中溶菌酶含量与不同龋易感性的关系尚不明确。

乳铁蛋白是中性粒细胞和浆液性腺上皮细胞合成的一种和铁结合的糖蛋白。LF 可发挥蛋白水解酶活性降解细菌黏附蛋白，减少细菌黏附、定植。LF 具有很强的螯合能力，通过摄取细胞中的铁，表达抑菌功能，多种生长过程中需铁的革兰阳性菌、革兰阴性菌、需氧菌、厌氧菌及酵母菌对其敏感，如变异链球菌、轻链球菌、唾液链球菌等。LF 的抑菌作用限制了种类更多、数量更庞大的细菌对牙面、黏膜表面的吸附。

唾液凝集素（salivary agglutinin）指那些在唾液中能与细菌起作用并导致其凝集，通过唾液冲刷作用及咀嚼食物的摩擦、吞咽作用使其从口腔中排除的物质。包括从腮腺唾液中分离的高分子量（107Da）糖蛋白、β_2 微球蛋白（β_2-microglobulin）、纤维连接蛋白（fibronectin，Fn）及 GP340 等。凝集素可以减少吸附至口腔各器官的细菌数量。其中，β_2 微球蛋白的主要功能是凝集多种口腔链球菌，包括变异链球菌。Fn 也可凝集变链菌，但在口腔中作用较弱，原因是唾液中的细菌蛋白酶能使 Fn 降解。唾液 GP340 能够凝集多种细菌，从而促使其排除，GP340 还有抗病毒活性。当凝集素可溶性地存在于唾液中时，其凝集、抗菌作用明显；而当凝集素结合至牙面时，其促进细菌的黏附、定植。

5. 其他蛋白 研究表明，唾液中的硫酸糖蛋白、磷蛋白属于大分子的血型活性物质，具有许多阴离子，对牙齿 HA 有高度的亲和力，容易吸附在牙齿表面。这种与牙面结合的硫酸蛋白又可以与含有磷壁酸的细菌结合，使细菌黏附在牙面上。磷壁酸是许多革兰阳性细菌胞质和细胞壁的重要组成部分，它含有带负电荷的磷酸基团，对 HA 有很大的亲和力，其机制主要是通过磷酸基团与釉质钙的结合。

唾液中尚含微量血液来源的清蛋白。清蛋白等生物大分子可吸附至 HA 晶体的表面，用清蛋白处理 HA 表面可以导致部分细菌的选择性吸附。当口腔环境中磷酸盐缓冲成分浓度下降或 pH 降低时，清蛋白在 HA 晶体表面的吸附增加，反之清蛋白吸附减少，进而影响清蛋白直接促进的细菌吸附。有研究证实疏水作用在细菌与 HA 等矿物之间的作用表现为引力，清蛋白可以抑制疏水作用，因此影响了疏水作用介导的细菌吸附。

唾液中的细菌来源蛋白成分在细菌的黏附过程中有着重要作用，如葡糖基转移酶（GTF），在蔗糖诱导的变异链球菌黏附中起关键作用。这种酶既能吸附至获得性膜上，又可存在于变异链球菌细胞表面。由 GTF 产生的葡聚糖链在细菌表面和牙面之间相互作用形成强有力的结合。GTF 的作用特征是对蔗糖有高度特异性，不能利用其他糖；具有较宽的 pH

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

作用范围(5.2~7.0),与菌斑 pH 范围一致;微生物能产生这种酶,不需要诱导剂。

综上所述,有些唾液蛋白可以促进细菌的黏附和牙菌斑生物膜的形成,有些能直接或间接抑制细菌的黏附,充分说明了微生物在牙齿表面黏附是一个复杂的过程。全唾液的蛋白构成复杂,除有完整蛋白分子的存在,还有许多蛋白分子的降解片段发挥不同的作用,目前对唾液蛋白质的认识尚处初期。随着蛋白质组学快速发展,一个新兴的、具有重要意义的研究领域——唾液蛋白质组学(salivary proteomics)正在兴起,它以“组学”的研究思路寻找、发现和鉴定唾液中与疾病过程和治疗过程相关的生物标志物(蛋白质、多肽)。得益于此,人唾液蛋白 CSP-1(common salivary protein 1)被发现可以促进变异链球菌对实验性唾液获得性膜及 HA 表面葡聚糖的黏附;牙龈卟啉单胞菌脂多糖(Pg. LPS)能结合唾液中的 α-淀粉酶、血清胱抑素、催乳激素诱导蛋白、溶菌酶 C、免疫球蛋白组分、清蛋白、载脂蛋白 1 及下颌下腺雄激素调节蛋白质 3B,这些蛋白质被认为与细菌黏附与定植密切相关。

五、与黏附相关的微生物因子(黏附素)

口腔中存在着不同的组织表面,按黏附表面的特性来看,大致可分为硬组织面(牙面、修复体表面)与软组织面(连续或不连续的黏膜表面)。在硬组织表面上,微生物并非直接与无机基质相连,而是通过对表面吸附的唾液获得性膜的黏附来获得定植的基础。在软组织面上,微生物主要黏附于黏膜表面,在特殊情况下,当黏膜出现破损,微生物也可透过不连续的黏膜面而侵入组织深层(图 5-10)。

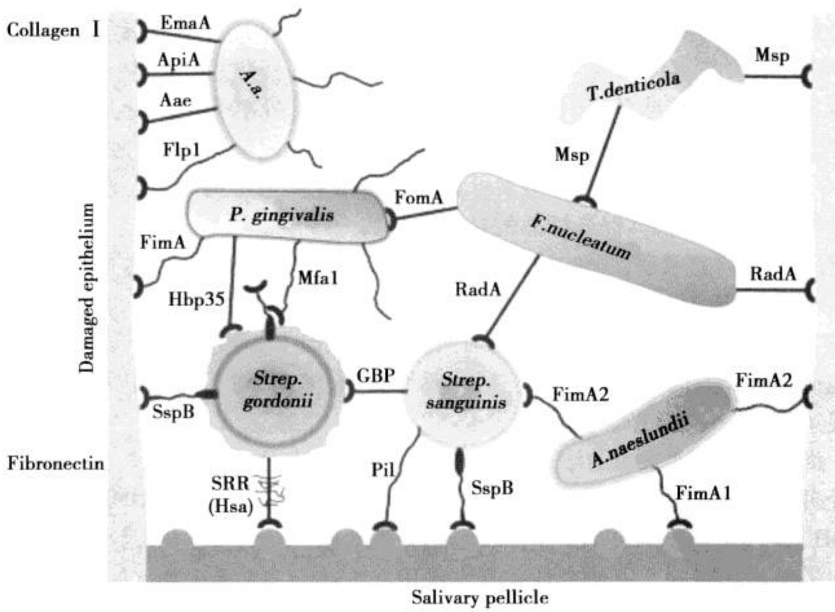


图 5-10 微生物与宿主上皮细胞、唾液获得性膜被覆的牙面以及早期黏附细菌之间的黏附示意图

注:图片摘自:A. H. Nobbs, H. F. Jenkinson, N. S. Jakubovics. Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence. J Dent Res, 2011, 90(11): 1271-1278

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

（一）对唾液获得性膜的黏附

在牙面清洁后唾液内的一些成分就会很快地吸附于其上，形成一层结构均匀无细胞的薄膜，而这一唾液获得性膜也即构成了微生物在牙面黏附的基底层，微生物通过菌体细胞上的各种黏附素对其获得黏附定植（图 5-11）。

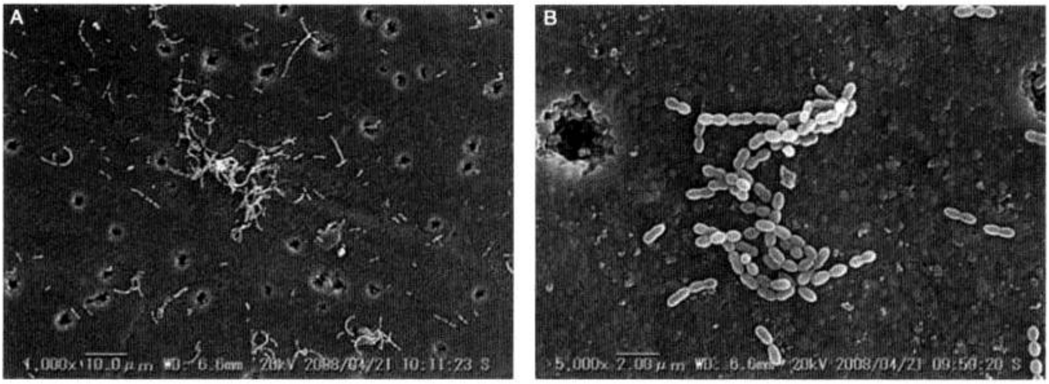


图 5-11　扫描电镜观察血链球菌 *S. sanguinis* JCM 5708^{T} 对唾液获得性膜包被的羟磷灰石表面的黏附

注：A. 为放大 1000 倍；B. 为放大 5000 倍。图片摘自：K. Hojo, S. Nagaoka, T. Ohshima, et al. Bacterial interactions in dental biofilm development. J Dent Res, 2009, 88: 982

1. 富丝氨酸重复蛋白族[serine-rich repeat(Srr) protein family]　细菌表面黏附素 Srr 可以识别唾液获得性膜中的糖基成分。Srr 蛋白由链球菌、葡萄球菌、乳杆菌等合成，并可形成细菌的胞外附属器（如鞭毛、纤毛等）。这些蛋白最主要的特征就是富有丝氨酸的重复序列（可达蛋白全序列的 80%）。对副血链球菌（streptococcus parasanguinis）Srr 族蛋白 Fap1 的研究发现其羧基端内的二肽 S(V/I/E) 重复形成超螺旋结构，从而使氨基端从细胞表面伸展出去而形成纤毛。更多的研究也发现黏附素 Fap1 对唾液获得性膜的黏附过程受到环境的影响，在低 pH 环境（pH=5～8）时，Fap1 有着明显的构象改变，黏附功能区向纤毛顶端聚集，从而显著增强了 Fap1 对唾液包被的羟磷灰石的黏附能力。在口腔微生态环境中，副血链球菌也表现出了耐酸的特性，在酸性环境中其对牙面的黏附能力显著增强。

在口腔中另一常居菌戈氏链球菌中也发现了 2 种 Srr 族蛋白，分别是 Has 与 GspB。两者均能识别唾液获得性膜中的涎酸成分（如唾液黏蛋白 MG2 与唾液凝集素 salivary agglutinin 等），在细菌早期黏附与生物膜形成过程中，这些 Srr 族蛋白中不同的结构域被发现起着重要的作用，这也提示这些细菌黏附素可能有着多种黏附机制同时参与细菌的黏附过程。

2. 抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽　为了在口腔这一复杂的生态环境中生存与定植，微生物必须发展出多种黏附机制，抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽也是其中较常见的一类黏附素。抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽（也曾被称为 P1、SpaP、PAc 或 AgB），广泛存在于绝大多数的链球菌细胞表面，分子大小约 1500～1566 个氨基酸。这些线状多肽结构复杂，具有多个受体结合位点，可以与唾液糖蛋白、其他菌细胞以及钙结合。N 基末端区域优先与唾液糖蛋白结合，C 基端多肽包含菌种特异性黏附介导序列，仅与表面相关糖蛋白结合。某些抗原Ⅰ/Ⅱ蛋白被发现可特异性地识别唾液获得性膜中的某些成分，尤其是固有免疫系统的清道夫受体（innate immunity scavenger

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

receptor)糖蛋白-340(gp-340)。这一免疫受体蛋白由上皮细胞产生,并吸附于牙面上,细菌抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽对这一受体的识别利于其对牙面的黏附。在口腔中,目前已鉴定出3种糖基化的gp-340,变异链球菌对gp-340-Ⅰ型受体的黏附能力显著高于另两种糖型的gp-340(Ⅱ/Ⅲ)。临床研究也发现gp-340-Ⅰ产量高的个体,其患龋率也有着显著的升高。

抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽通过折叠形成伸长的纤维结构,从链球菌细胞表面伸展出去而在菌细胞两端形成可能的黏附功能域。现有研究发现抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽的gp-340的识别位点有助于链球菌发生在50nm距离上的早期吸附,而多肽紧邻胞壁的羧基端则有助于更短距离上的链球菌后续黏附过程。对戈氏链球菌SspB蛋白的晶体构象分析发现(图5-12),在羧基端存在有两种不同的黏附结构域,并均可与赖氨酸或天冬酰胺残疾形成共价键结合,而这样的分子内交联作用有助于延长细胞附属器,并使菌细胞更有效地黏附于介质表面。

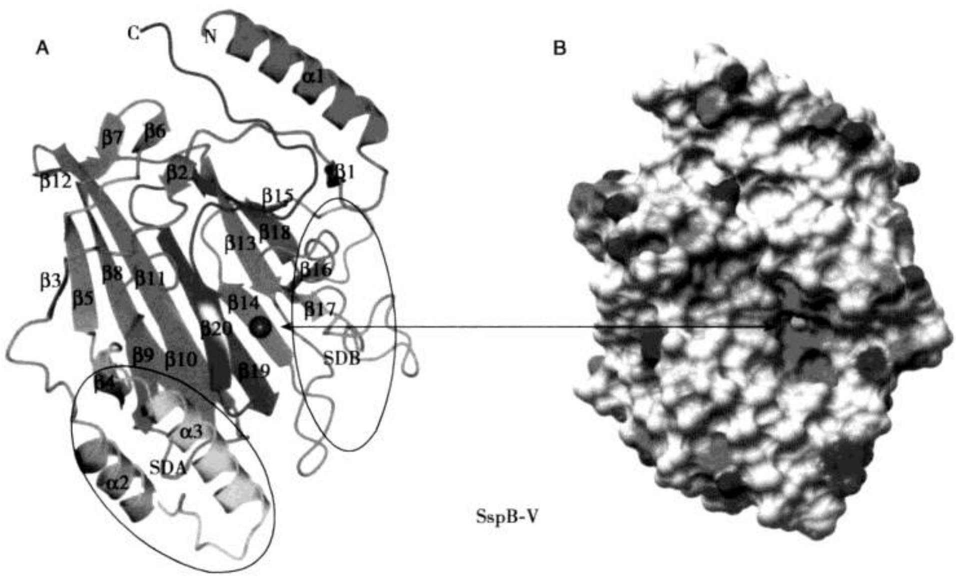


图5-12 链球菌SspB蛋白多变区构想图

注:A图为蛋白模式图,红色为氨基端,蓝色为羧基端,蛋白中心为免疫球蛋白样的β-三明治结构,有着可能的Ca^{2+}结合位点(箭头所指),两端为两个亚单位SDA与SDB。B图为蛋白的表面电势图,蓝色表示负电荷,红色表示正电荷。图片摘自:Forsgren N, Lamont RJ, Persson K. Crystal structure of the variable domain of the Streptococcus gordonii surface protein SspB. Protein Sci, 2009, 18(9):1896-1905

3. 其他外膜蛋白——FomA　革兰阴性菌的黏附素可以分成两类:菌毛黏附素和非菌毛黏附素,后者包括自转运分子(autotransporter)和外膜蛋白(outer membrane proteins, OMPs)。FomA是由具核梭杆菌合成的OMP分子,是革兰阴性菌典型的孔蛋白(porin proteins),在胞壁脂双层上由一系列跨膜的β折叠形成菌细胞的跨膜通道。这些孔蛋白的主要作用是提供对小分子的非特异性扩散通道,FomA也能介导对唾液获得性膜中富酪蛋白成分的黏附。

(二)对宿主软组织的黏附

成人口腔组织表面积约为215cm^2,其中上皮细胞表面也成为微生物黏附的一个主要场所,而在黏膜上皮表面,细菌通过菌毛(或纤毛)以及特异的外膜蛋白分子等黏附素识别上皮

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

细胞表面所表达的受体分子或者细胞外基质成分，从而黏附于软组织表面。

1. 菌毛/纤毛蛋白　类似于 Srr 与抗原Ⅰ/Ⅱ蛋白等纤毛黏附素在参与对唾液获得性膜黏附的过程外，同时也积极参与到对宿主组织的黏附。菌毛蛋白也参与了对宿主组织的黏附。革兰阳性菌的菌毛是由分选酶(sortase)C 介导的蛋白质亚单位聚合而成的伸展出细胞表面可达 3μm 的细胞附属器，并多携有黏性的末端，以利于对黏膜上皮的黏附。

血链球菌(*Streptococcus sanguinis*)的菌毛是由 3 个不同的亚单位(PilA、B、C)组成的多聚蛋白体，可以促进对纤维连接蛋白(fibronectin)与上皮细胞的附着。在内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)上也发现了 2 种不同的菌毛位点：Ⅰ型 Fim P/Q 与Ⅱ型 Fim A/B。Ⅰ型菌毛有助于 *A. naeslundii* T14V 菌株(现归属于 *A. oris*)对唾液获得性膜上的富脯蛋白的黏附；而Ⅱ型菌毛则可特异性地识别其他口腔细菌或宿主细胞表面的半乳糖-半乳糖胺(Gal-GalNAc)调控结构。

纤维状蛋白在革兰阴性菌中也是一种重要的黏附素。牙周主要病原菌牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)有着长短两类纤毛，长纤毛(也称主纤毛，长度约为 0.3～1.6μm)是菌细胞的主要纤毛。此外，还有 80～120nm 长的短纤毛。这些纤毛的主要蛋白成分是 FimA 与 Mfa1。主纤毛可以特异性地识别上皮细胞表面的 $\alpha_V\beta_3$ 与 $\alpha_5\beta_1$ 整联蛋白(integrin)受体，是牙龈卟啉单胞菌对牙龈上皮(gingival epithelial cells，GECs)黏附的主要调控成分。至今 FimA 已被发现存在 6 种对整联蛋白有着不同亲和力的构相，并与牙龈卟啉单胞菌的致病性密切相关。主纤毛的辅助亚单位 FimCDE 也被证明可结成功能复合体以调控与胞外基质蛋白、纤维连接蛋白(fibronectin)与Ⅰ型胶原的结合。牙周病原菌伴放线菌聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)可以产生长纤毛而组装成Ⅳ型菌毛，调节对于多种表面包括唾液获得性膜的黏附，提示伴放线聚集杆菌可能是牙面的早期定植菌。

具核梭杆菌(*F. nucleatum*)的 FadA 纤毛蛋白由于其在致病中的重要作用，近年成为研究的焦点之一。FadA 存在有 2 种形式：非分泌型 pre-FadA(129 个氨基酸残基)与分泌型成熟的 FadA(mFadA，111 个氨基酸残基)，后者通过晶体构象分析证明各个亚单位首尾相连接成亮氨酸(leucine)链状结构域以形成延长的纤毛结构(图 5-13)。FadA 已被证明有助于具核梭杆菌对上皮与内皮细胞的黏附与侵入，但这些功能依赖于 pre-FadA 与 mFadA 的共存。

2. 外膜蛋白(outer membrane proteins)-Msp　口腔螺旋体，如齿垢密螺旋体(Treponema denticola)与牙周病的发展密切相关。其主要的黏附素是表面蛋白 Msp(major surface protein，Msp)。其氨基端与许多黏附特性密切相关，包括与胞外基质蛋白、纤维连接蛋白(fibronectin)、纤维蛋白原(fibrinogen)、层粘连蛋白(laminin)、Ⅰ型胶原与上皮成纤维细胞或牙龈成纤维细胞的黏附。

3. 自转运黏附素(auto-transporter adhesins)-EmaA　革兰阴性菌中除了表面纤维蛋白外的另一大类黏附素是自转运分子。自转运分子可以实现向细胞表面的转运，并有着广泛的生理功能，包括凝结宿主细胞肌动蛋白(actin)与调控细胞凋亡(apoptosis)。这些蛋白可以分成 3 个功能域：氨基端信号序列、中央功能域与羧基端转运单位。信号序列通过 Sec 系统导引蛋白进入外周胞质(periplasm)，转运单位插入到细胞外膜形成一个 β 桶状的通道，以利于分子的通过。当分子转运到胞膜外时，中央功能域就可获得表达，而转运域则锚定于胞膜表面。

牙周致病菌伴放线菌聚集杆菌可以表达至少 3 种自转运黏附素，即 Aae、ApiA 与 EmaA。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

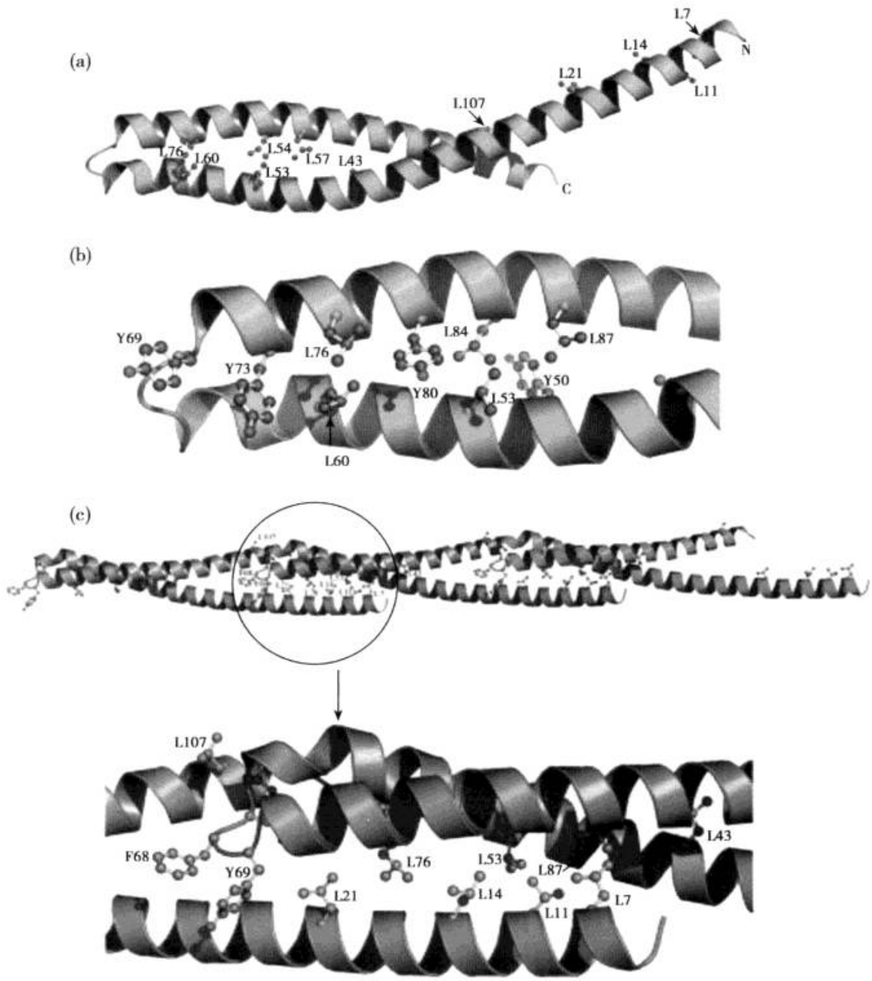


图 5-13　FadA 蛋白的晶体结构图

注：(a)蛋白模式图，图中的小球与杆代表亮氨酸(leucine)残基位点；(b)为发夹部位的局部放大图，显示亮氨酸与酪氨酸(tyrosine)的连接关系，羟基酪氨酸以红色小球表示；(c)为 FadA 蛋白三聚体的示意图。图片摘自：Stanley Nithianantham，Minghua Xu，Mitsunori Yamada，et al. Crystal structure of FadA adhesin from fusobacterium nucleatum reveals a novel oligomerization motif，the leucine chain. J Biol Chem，2009，284(6)：3865-3872

Aae 与 ApiA 蛋白促进伴放线菌聚集杆菌对人类颊上皮细胞与牙龈上皮细胞的黏附，而 EmaA 则可与Ⅰ型胶原特异性结合。EmaA 与另两个自转运分子有着完全不同的结构，其可以形成卷曲的糖基化三聚体以形成天线样的结构突出于细胞表面。这些构成一个约 150nm 的杆状结构，末端有个椭圆形的帽状结构，此末端就是胶原结合域。

（三）共聚集与共黏附

在口腔表面上获得早期的黏附的细菌提供了新的黏附受体，从而有助于其他细菌在其上形成更多的黏附，也更有利于生物膜的多样性表达（图 5-14）。在浮游状态下细菌之间的互相黏附称为共聚集，而对于口腔表面多种细菌之间共同的黏附称为共黏附，两者的机制在

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

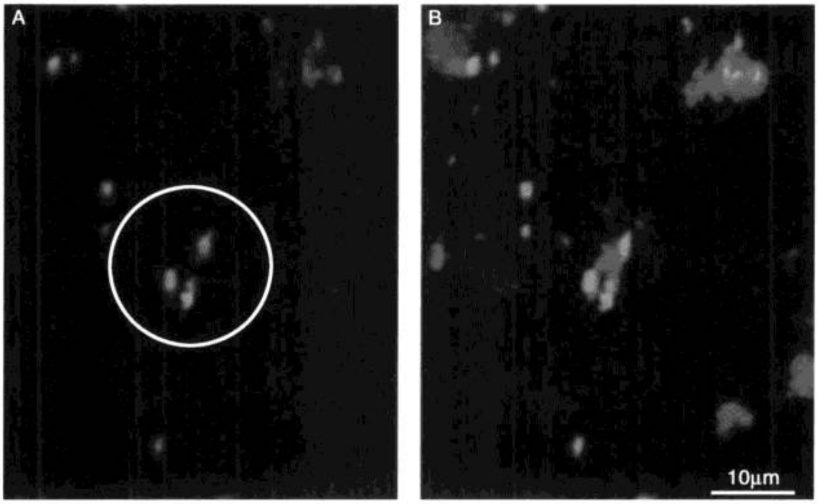


图 5-14 在釉质片模型上利用荧光免疫原位杂交(FISH)技术观察细菌间的共聚

注:图片摘自:Chalmers N. I., Palmer R. J. Jr, Cisar J. O., et al. Characterization of a Streptococcus sp-Veillonella sp. community micromanipulated from dental plaque. J Bacteriol, 2008, 190:8145-8154

很大程度上是一致的,因此广义下的微生物共聚现象就包含了这两者。

1. 抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽 正如前文所述,链球菌抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽在对宿主基质的黏附中有着重要的作用,但同时这些多肽也是细菌间共聚作用的主要黏附素。戈氏链球菌的 SspA 与 SspB 多肽可以直接识别牙龈卟啉单胞菌。SspB 包含了 BAR 结构域(SspB adhesion region, BAR),该结构域可以特异性地识别牙龈卟啉单胞菌的短纤毛。而对 SspB 的空间结构分析显示,BAR 结构域可以形成一个类似把手的细胞突出结构,借助对 BAR 的识别从而结合到牙面黏附的先锋菌戈氏链球菌,是牙龈卟啉单胞菌对牙面黏附的主要机制。

戈氏链球菌的抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽也在对放线菌与白假丝酵母菌的共聚中发挥重要作用。SspB 蛋白可以调控与放线菌 *A. oris* T14V 株的共聚,而 SspA 则不能调控与放线菌 *A. oris* T14V 株的共聚,仅参与对放线菌 *Actinomyces sp.* PK606 的识别。戈氏链球菌 SspB 可通过与白假丝酵母菌糖蛋白受体 Als3p 结合促进两菌间的共聚,Als3p 是白假丝酵母菌特异性的菌丝胞壁蛋白,可参与白假丝酵母菌多种黏附过程。还有多种糖基磷脂酰肌醇锚蛋白(glycosylphosphatidylinositol anchored proteins, GPI anchored protein),如 Hwp1、Eap1 与 Rbt1,可与链球菌结合从而利于白假丝酵母菌对牙面黏附。

2. 菌毛/纤毛蛋白 除了抗原Ⅰ/Ⅱ族多肽外,放线菌 *A. oris* T14V 株与口腔链球菌(*Streptococcus oralis*)间的共聚作用还包括了放线菌Ⅱ型菌毛对链球菌多糖受体(Streptococcus receptor polysaccharides, RPS)的识别,菌毛杆部蛋白 FimA 起着凝集素样的作用。

牙龈卟啉单胞菌通过短菌毛(Mfa1)特异性地与戈氏链球菌共聚。而链球菌 *S. cristatus* 与 *S. intermedius* 的胞外精氨酸脱亚氨酶(extracellular arginine deiminase)可以下调 mfa 的表达与抑制牙龈卟啉单胞菌生物膜的形成。精氨酸脱亚氨酶的信号功能域位于蛋白的羧基端,且其信号功能并不依赖于酶活性表达。但在戈氏链球菌中精氨酸脱亚氨酶的表达量很

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

低，不能介导 mfa 的表达下调，这提示着牙龈卟啉单胞菌菌毛对受体的识别有种属的特异性。

3. 外膜蛋白——RadD、FomA、HBP35 与 Msp　大量的体外研究发现具核梭杆菌可与多种细菌发生共聚作用，而这样复杂的共聚效果也提示具核梭杆菌可能是以桥梁的形式介导多菌种共同形成生物膜。荧光免疫原位杂交实验（fluorescence in situ hybridization，FISH）也发现具核梭杆菌定植于生物膜的中间层，这一观察结果也支持了具核梭杆菌在生物膜形成中的桥梁作用（图 5-15）。具核梭杆菌对于口腔链球菌的黏附取决于菌细胞表面的精氨酸敏感性蛋白黏附素。对具核梭杆菌 ATCC10953 的研究发现，当 RadD 蛋白缺陷后，突变株不能与 *S. cristatus*、*S. gordonii* 与 *S. sanguinis* 等链球菌共聚。RadD 蛋白目前已被证实是一种可被精氨酸抑制介导具核梭杆菌与链球菌共聚的主要黏附素之一。

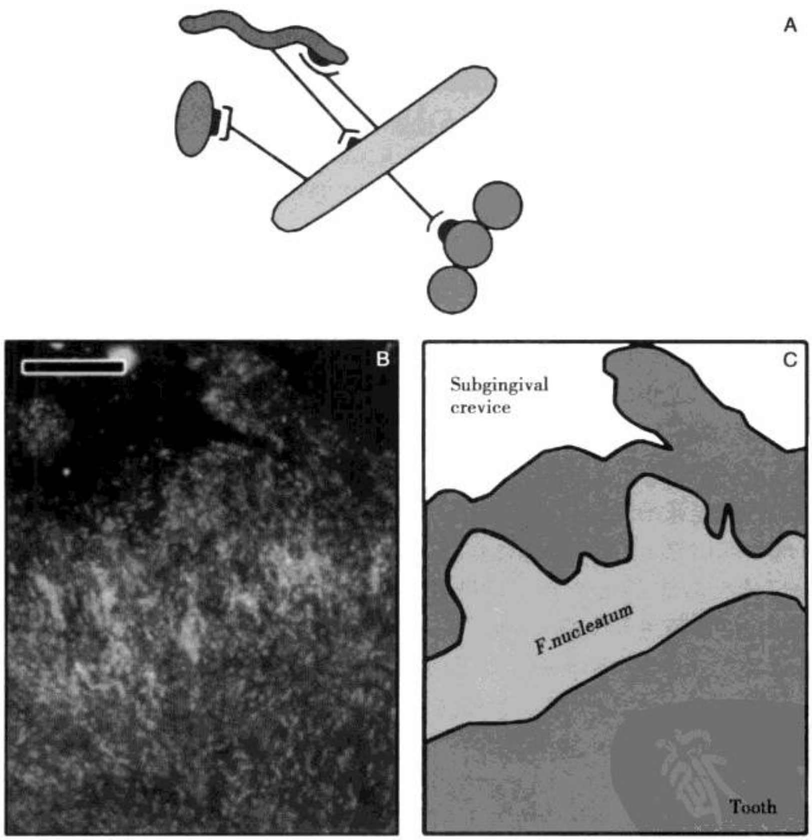


图 5-15　具核梭杆菌在生物膜形成中的桥梁作用

注：A. 具核梭杆菌（橙色）与早期定植菌及后期定植菌间的共聚作用示意图；B. 荧光免疫原位杂交 FISH 实验观察到具核梭杆菌（橙色）在生物膜中的定位及其模式图（C）。图片摘自：A. H. Nobbs，H. F. Jenkinson，N. S. Jakubovics. Stick to your gums：mechanisms of oral microbial adherence. J Dent Res，2011，90（11）：1271-1278

具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌之间的共聚依赖于细胞表面约 42kDa 的黏附素 FomA，该凝集素样黏附素不受精氨酸的影响，仅对乳糖（lactose）敏感。在体外生物膜形成模型中，牙

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

龈卟啉单胞菌与具核梭杆菌同时接种后，其生物膜形成量显著多于单菌接种之和，而在加入抗 FomA 抗体后，这一菌种间的协同作用则可被抑制。在对牙周病致病的动物模型上，也验证了针对 FomA 的免疫治疗可以显著降低牙周的炎症水平。

牙龈卟啉单胞菌的非纤毛蛋白，包括精氨酸牙龈蛋白酶（Arg-gingipain）、赖氨酸牙龈蛋白酶（Lys-gingipain）与红细胞凝集素（hemagglutinin，Hag）等，可以产生胞膜小体，也有助于其与多种菌细胞间的共聚。体外实验中，抗外膜蛋白 HBP35（胞膜小体中的主要成分之一）的抗体可以显著抑制牙龈卟啉单胞菌与放线菌 *A. naeslundii* 等其他菌间的共聚。*hbp*35 基因突变株对 *S. gordonii*、*S. mutans* 或 *A. naeslundii* 的共聚现象也显著低于野生菌株。

牙龈卟啉单胞菌也可与齿垢密螺旋体（*T. denticola*）共聚，并在生物膜生长中结成共生关系。两者的共聚依赖于齿垢密螺旋体的 Msp 蛋白。同样，Msp 蛋白也可介导齿垢密螺旋体与具核梭杆菌的共聚，但与牙龈卟啉单胞菌不同的是，Msp 与具核梭杆菌间的共聚受半乳糖（galactose）的抑制，因此去糖基化的 Msp 与 N-糖苷酶 F（N-glycosidase F）可以抑制齿垢密螺旋体与具核梭杆菌间的共聚，但不能抑制与牙龈卟啉单胞菌间的共聚。进一步的分析提示 Msp 上的糖分子与具核梭杆菌黏附，而其与牙龈卟啉单胞菌的黏附则依赖于 Msp 的肽链骨架。

六、黏附介质的作用

黏附是微生物在特定的组织表面定植的首要条件，是微生物与宿主发生关系和致病的基础。以变链菌为例，目前关于其黏附机制的研究认为，细菌黏附的第一阶段是非特异性黏附，即非蔗糖依赖性黏附；第二阶段是变链菌的葡糖基转移酶（glucosyl transferase，GTF）利用蔗糖合成水不溶性葡聚糖，来介导该菌的蔗糖依赖性黏附和聚集。

（一）蔗糖与黏附

关于蔗糖在龋病发生、发展中的作用，目前已经得到一致公认。众多研究表明，在种类繁多的碳水化合物中，蔗糖的致龋能力最强，不仅能够被变异链球菌等主要致龋菌株利用来发酵产酸，而且还介导了菌斑生物膜在牙齿表面的黏附这一重要过程（图 5-16）。

口腔多种细菌均可利用蔗糖产生胞外多糖（extracellular polysaccharides，EPS）和胞内多糖（intracellular polysaccharides，IPS）。EPS 包括水不溶性葡聚糖及水溶性葡聚糖。其中胞外水溶性多糖可作为一种细菌胞外贮能形式，参与菌斑代谢。而胞外水不溶性多糖则主要参与菌斑基质的组成、介导细菌的黏附、促进细菌集聚和菌斑的形成（图 5-17）。

变异链球菌的胞外水不溶性多糖主要是水不溶性葡聚糖，这些细胞外多糖可与生物膜中众多的大分子发生相互作用，如凝集素、蛋白质、脂质、其他细胞外多糖分子以及低分子量的无机离子等，进而形成由多糖分子和其他大分子组成的骨架结构，将生物膜中的细菌和细菌的产物网聚于其中，在生物膜中形成一种复杂的三维网架结构（图 5-17），其具体作用为：

1. 可促进菌斑生物膜的形成并参与菌斑基质的组成。由于不溶性葡聚糖相互交链黏性大，具有较强的黏附聚集作用及较高的生物稳定性，不易被降解，对细菌在载体表面的附着以及细菌之间的黏附均起着十分重要的作用。

2. 由于不溶性葡聚糖本身分子之间有高度的多分枝结构，黏稠而不溶于水，因此可以对抗口腔中如唾液冲刷等对菌斑内细菌不利因素的影响，可以使其免受外环境中一些因素的危害，如抗生素、抗体、表面活性剂等。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

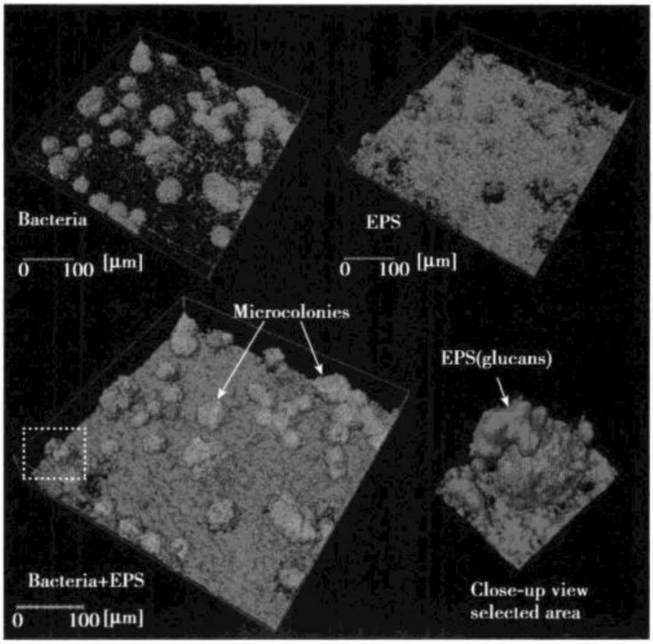


图 5-16　唾液包被羟基磷灰石 *S. mutans* 生物膜模型：EPS（红色）与 *S. mutans* 菌落（绿色）三维图像

注：图片摘自：Koo H, Xiao J, Klein MI, et al. Exopolysaccharides produced by Streptococcus mutans glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. J Bacteriol, 2010, 192(12):3024-3032

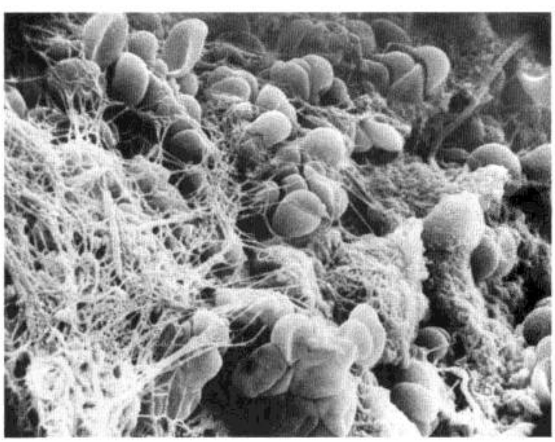


图 5-17　牙菌斑微生物与细胞外基质（蛋白质、多糖及脂类）

注：图片摘自：http://ohsu-hca.blogspot.com/2011/03/what-is-it.html

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

3. 限制牙菌斑生物膜内部营养物质及酸性产物的流失，维护菌斑局部生态环境稳定的同时，牙菌斑生物膜内的酸性代谢产物不易扩散出去，导致有机酸堆积于牙面-菌斑界面，pH降低，进而釉质脱矿。

不溶性葡聚糖既是牙菌斑生物膜中使细菌黏附于牙齿表面的“黏结剂”，也是维持牙菌斑生物膜基本结构的“骨架”，同时还起着稳定牙菌斑生物膜局部生态环境的“生物屏障”作用。

（二）胶原与黏附

胶原是牙本质和牙骨质的主要有机质成分。其中，牙本质的胶原成分占到其有机质成分的90%以上，以Ⅰ型胶原为主，Ⅲ、Ⅴ和Ⅵ型胶原也有报道。而牙骨质的胶原主要是Ⅰ型胶原和少量的Ⅲ型胶原。

变异链球菌的某些菌株对胶原的黏附具有一定的时间、浓度依赖性，但也有阈值控制。该种黏附具有较高的特异性，但不同菌株对不同类型胶原的黏附力不同，推测由于菌株具有不同的黏附素，因而黏附在胶原的不同分子片段上。只有能黏附到胶原上的阳性菌株才能黏附到牙根表面。随着与根管感染、再感染细菌病因学研究的不断深入，亦发现病原菌（如粪肠球菌）与根尖部牙骨质表面胶原纤维的密切结合（图5-18）。

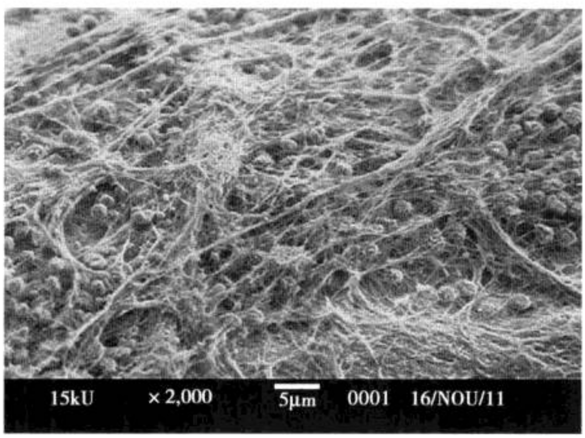


图5-18　根管再感染病例根尖1/3段扫描电镜图片

注：可见球状菌与胶原纤维的结合。图片摘自：Wang J, Jiang Y, Chen W, et al. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. J Endod, 2012, 38(7): 954-959

放线菌是目前公认的根面龋的主要致病菌，国内学者研究表明，Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原可明显促进放线菌在羟基磷灰石上的黏附，而且缺乏Ⅰ型菌毛的黏放菌对胶原黏附极低。黏放菌对胶原的黏附是Ⅰ型菌毛所含黏接素与胶原分子的结合。

乳杆菌滞留于龋损当中，被认为是龋病发展的结果，考虑到窝洞中暴露的牙本质中富含胶原纤维，有学者对其进行了相应研究，证实乳杆菌亦具有识别胶原的能力，这种识别包括特异性和非特异性的相互作用，可能使乳杆菌侵入牙本质或者牙骨质内。

（三）钙离子与黏附

钙桥/静电结合作用是有关细菌在牙面黏附机制的另一个理论（图5-19）。理论认为牙

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表面所覆盖的获得性膜主要是唾液糖蛋白,含有磺酰基团(—SO_3^{2-})和羧基(—$COOH^-$);一些细菌胞壁上的脂磷壁酸(lipoteichoic acid,LTA)存在磷酸基团(—PO_4^{3-}),本来由于糖蛋白和细菌均带负电荷,同性相斥,细菌与组织面不能完全接触,亦不能黏附于牙面。但因唾液中存在有大量带正电荷的钙离子(Ca^{2+}),使得牙面和细菌带负电荷的基团可以通过唾液中丰富的双价阳离子-钙的搭桥作用而结合起来,克服分子间的静电斥力,介导细菌黏附于牙面。

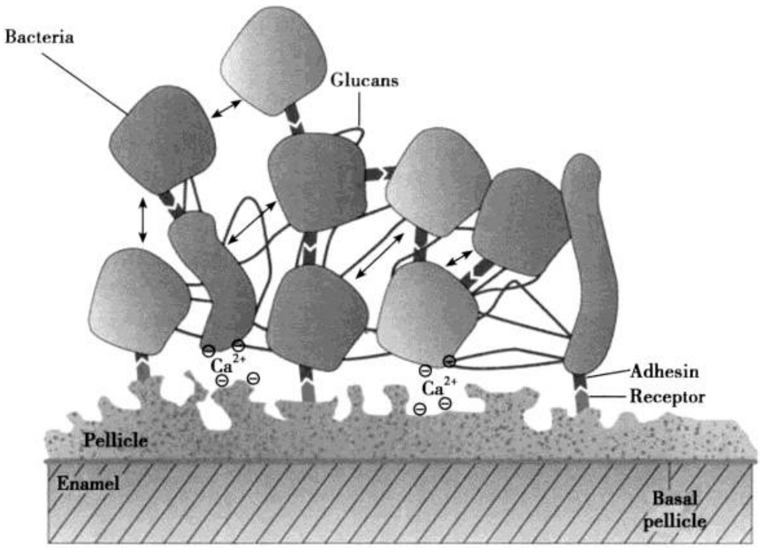


图 5-19　黏附学说示意图(蔗糖非依赖性黏附与钙桥学说)

表兄链球菌菌液中加入钙可增加黏附,钙不仅影响蔗糖非依赖性黏附,而且影响蔗糖依赖性黏附。钙和葡聚糖共同作用增大了细菌团。但促进黏附的钙需求量均有阈值,超过阈值黏附量反而下降。由于钙具有活化和稳定蛋白质的作用,学者推测钙是通过活化和稳定菌体表面的葡聚糖受体(如葡聚糖结合蛋白)而促进葡聚糖凝集细菌,增大细菌团,从而增加黏附。

(黄正蔚　姜云涛　马瑞　杨德琴)

参考文献

1. 刘正. 口腔生物学. 北京:人民卫生出版社,2012
2. 周学东. 实用口腔微生物学与技术. 北京:人民卫生出版社,2009
3. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res, 2011, 45:69-86
4. Chalmers NI, Palmer RJ Jr, Cisar JO, et al. Characterization of a *Streptococcus sp.* -*Veillonella sp.* community micromanipulated from dental plaque. J Bacteriol, 2008, 190:8145-8154
5. Fenno JC. *Treponema denticola* interactions with host proteins. J Oral Microbiol, 2012, 4:10
6. Forsgren N, Lamont RJ, Persson K. Crystal structure of the variable domain of the *Streptococcus gordonii* surface protein SspB. Protein Sci, 2009, 18:1896-1905

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

7. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, et al. Bacterial interactions in dental biofilm development. J Dent Res, 2009, 88: 982-990

8. Koo H, Xiao J, Klein MI, et al. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. J Bacteriol, 2010, 192: 3024-3032

9. Marsh PD, Martin MV. Oral Microbiology. Elsevier, Churchill Livingstone, 2009

10. Nithianantham S, Xu M, Yamada M, et al. Crystal structure of FadA adhesin from *Fusobacterium nucleatum* reveals a novel oligomerization motif, the leucine chain. J Biol Chem, 2009, 284: 3865-3872

11. Nobbs AH, Jenkinson HF, Jakubovics NS. Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence. J Dent Res, 2011, 90: 1271-1278

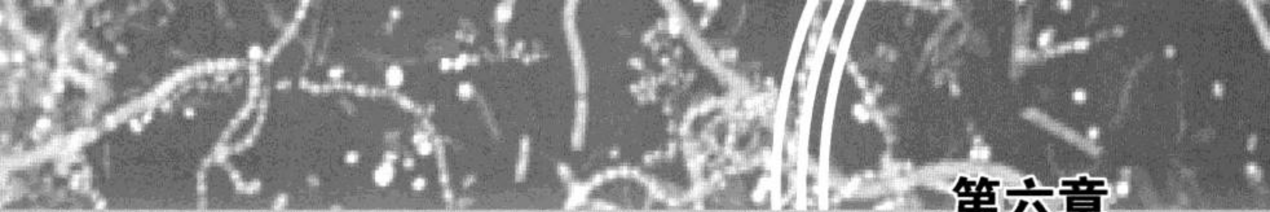
12. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus adherence* and colonization. Microbiol Mol Biol Rev, 2009, 73: 407-450

13. Palmer RJ Jr, Kazmerzak K, Hansen MC, et al. Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. Infect Immun, 2001, 69: 5794-5804

14. Wang J, Jiang Y, Chen W, et al. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. J Endod, 2012, 38: 954-959

15. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Annu Rev Microbiol, 1996, 50: 513-552

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



第六章 口腔生态系动力学

动力学(dynamics)是力学的一门分支,是研究运动和运动发生与变化的原因,即作用于物体的力与物体运动的关系。生态系动力学是研究生态系中生物体的运动特点和发生的机制以及伴随发生的物理和化学的变化,生物体的行为学和遗传学的变化即多样性及新物种的形成是生态系动力学研究的重要内容。

生态学的核心问题是生态平衡和生态失调,生态平衡和生态失调是生态系动力学的基本表现形式。因此,生态系动力学也是生态学研究的核心问题和永恒的主题。在复杂而万千变化的口腔生态系中,微生物群落的行为特点、变化、引发的原因以及与口腔健康和疾病的关系皆与口腔生态系的动力学有关,这是一个既让学者们感兴趣而又知之不深的课题。

在已有的微生态系动力学研究中,微生态系的动力学包括了微生物群落的演替(succession)、宿主转换(transition)和易位(translocation)以及三流(能量流、物质流和基因流)运转假说。随着对微生态学学科的不断了解和相关研究的深入,笔者认为生态系动力学不仅是生态系存在的基础和演变的启动者,而且是微生态系中微生物与环境相互依赖和相互制约关系研究的精髓。

有关演替、宿主转换和易位只是生态系动力学的表现形式,而能量流、物质流和信息流则是生态系动力学发生的基础。物质流和信息流使生态系群落与环境形成统一而完整的生物系统,不仅影响生态系中生物群落的数量、成活率、行为和群落演替以及新物种的形成,并且维持和调节生态系的稳定性和生态平衡。在三流学说中,能量流和物质流是生态系运转的动力机制,信息流是生态系动力的指挥者,主导着物质流和能量流的运转,也就主导着生态系的动态平衡和正常的生命活动。

第一节 生态系的动力学基础

一、能量流

生命体内发生的一切生化反应都伴随着能量的变化,包括消耗能量(吸能反应)、释放能量(放能反应)和能量转换,这种能量的变化和转换称为能量流。能量流是生态系的动力学基础,一切生命活动都依赖于生物体之间以及生物体与环境之间的能量流动和转换,没有能量流动就没有生命过程。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

(一)代谢与能量

微生物细胞和机体组织细胞一样,是一个可以进行化学转化的"机器",当有机物或无机物被氧化时能释放出被称为化学能的能量。同时,化学反应过程也伴随着能量的转换,能量可以从一种形式转变成另一种形式。生物体能量单位通常用千卡(kcal)表示,而微生物体中的能量单位则用千焦或千焦耳(kilojoule,kJ)表示,kJ 是国际上表示做功和热量的单位。

生物体内进行的多种类型的化学转化在生物学上被称为代谢或新陈代谢,包括机体组织细胞和定植的正常微生物细胞产生的各种类型的化学反应。新陈代谢是生命活动的基本特征,是生物体生长繁殖和维持生命的一系列化学反应的总称,也是保持其细胞结构和生命活动的动力。新陈代谢包括物质代谢与相伴的能量代谢,所以新陈代谢也被视为是活的生物体不断进行物质和能量的交换过程,一旦物质和能量的交换停止,生物体的正常结构和生命活动将中止。

在物质代谢过程中,物质的变化与能量的代谢是紧密联系着的,在生物体内物质代谢过程中所伴随的能量释放、转移和利用等,又称为能量代谢或能量流。

物质代谢通常被分为分解代谢和合成代谢,前者是将生物体内复杂的大分子(如蛋白质、多糖和脂类)分解成小分子的过程,这些小分子被细胞摄入并被转化为更小的分子,又称生物分解或异化作用。在分解代谢过程中,营养物质蕴藏的化学能被释放出来,故称放能反应,这些化学能经过转化成为生命活动的能源。而后者是将小的前体物质(如 α-丙酮酸)或构件分子(如氨基酸和单糖)合成大分子组分(如蛋白质和核酸)的过程,又称生物合成或同化作用,在此过程需要供给能量,故称吸能反应。

腺嘌呤核苷酸三磷酸(adenosine triphosphate,ATP)是生物能量代谢的放能反应与吸能反应之间,能量偶联即能量传递的传递体或媒介物。ATP 又称为高能化合物,是一种存在于所有细胞中的小分子物质,是细胞活动的直接能源,能将化学能转变为机械能,并将能量从一个能量点转移到另一个能量点。

生物体通过 3 种反应获得 ATP,即光合磷酸化、基质水平磷酸化和呼吸链或氧化磷酸化。口腔细菌形成 ATP 的经典模式是基质水平磷酸化反应,即直接从磷酸化的有机化合物传递一个高能量的磷酸分子给 ADP,从而产生 ATP 的反应过程。口腔生态系定植的大量乳酸菌,如链球菌、乳杆菌均可酵解葡萄糖生成乳酸或乙醇,释放能量并通过基质水平磷酸化保存在 ATP 的高能磷酸键中。

在有氧条件下代谢:葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)→2 乳酸($C_3H_6O_3$)+$2H^+$

(释放能量约为 196kJ/mol)。

在无氧条件下代谢:葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)→2 乙醇(C_2H_6O)+$2CO_2$

(释放能量约为 238.8kJ/mol)。

(二)化能异养型微生物的糖酵解与 ATP

微生物学家根据能量来源,即能量转换为 ATP 的机制,将微生物分为:利用光作为能源的光能营养微生物,又称光养生物或光能利用菌(phototroph);利用有机物或无机物作为能源的化能营养微生物,又称化养型或化能生物(chemotroph)。根据碳源的性质又将化能营养微生物划分为化能无机营养型(lithotrophs)[又称化能自养型(chemoautotrophy)]和化能有机营养型(organotrophs)[又称化能异养型(chemoheterotrophy)]。化能自养型微生物以 NH_4^+、NO_2 和 S 等无机物作为能源,以 CO_2 作为碳源;而化能异养型微生物以有机物作为能

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

源、碳源和氢供体。口腔生态系中的细菌和真菌多属于化能异养型。

糖酵解的过程包含了 ATP 的消耗和产生。糖是以碳、氢和氧(1∶2∶1)组成的化合物,是微生物构成细胞骨架的主要碳源,也是提供多数细胞生命活动所需能源的主要物质。葡萄糖(结构式:$C_6H_{12}O_6$)是含量最丰富的糖类,其 C_6(糖)是细胞壁多聚物(如肽聚糖)和能量储存物质的单体组分。口腔生态系的优势菌群大多能酵解葡萄糖,如链球菌(*Streptococcus spp*)、颗粒链球菌(*Granulicatella spp*)和放线菌(*Actinomyces spp*)等。

葡萄糖酵解最常见的 EM 途径如下:

1. 预反应　葡萄糖被 ATP 磷酸化→葡萄糖-6-P→果糖-6-P→1,6-二磷酸果糖(中间产物)→3-P 甘油醛(消耗 2ATP)。

2. 氧化　氧化时 3-磷酸甘油醛吸收无机磷,生成含高能磷酸键的 1,3-二磷酸甘油酸,在烯醇酶的作用下,磷酸甘油酸生成含高能磷酸的磷酸烯醇丙酮酸→丙酮酸(产生 4ATP)。

3. 还原　还原产物因微生物而异,如变异链球菌(*Streptococcus mutans*)通过其产生的乳酸脱氢酶将丙酮酸还原成乳酸,白假丝酵母菌则通过丙酮酸脱氢酶和乙醛脱氢酶将其还原成乙醇。还原反应产生的终末代谢产物在口腔厌氧菌鉴别上有着重要的意义,如乳酸杆菌产生大量的乳酸,丙酸杆菌以丙酸为主要终末代谢产物,放线菌则产生醋酸、乳酸和琥珀酸为主要终末代谢产物。

菌斑生物膜的研究指出一些细菌(如变异链球菌)分解蔗糖合成的水溶性细胞外多糖(soluble exopolysaccharides,insoluble EPS)是菌斑生物膜内能源和碳源的重要贮存方式,而一些口腔微生物(如白假丝酵母菌)可将糖类转化成细胞内多糖(intracellular polysaccharides,IPS),如糖原和支链淀粉(amylopectin)作为能源和碳源的另一贮存方式之一。

二、物质流

物质代谢是细胞生命活动的重要表现形式和生物体生存与发展的基础。在生态系中无论是组织细胞还是微生物细胞都存在着复杂的物质代谢活动,其中包括代谢物质的产生、流动和转换,微生态学者们将生态系中存在的代谢物质产生、流动和转换称为物质流(material flow)或代谢交流(metabolic communication)。

物质流也被定义为在生态系中物质运动和转化的动态过程,是各种物质沿着特定的途径进行交流和循环的趋势,包括构成生物体的各种物质(如氮、磷、碳、硫)以及各种生长及营养物质(如维生素、脂肪酸等)在生态系中不断传递和转化的过程。

不同物质流动的速率在空间和时间上都存在差异,在生态学中使用流通率这一概念来表示物质在单位时间、单位面积(或体积)的物质转移量。其影响因素包括元素的性质、微生物对物质的吸收和生长速率以及生态空间的条件、微生物利用代谢产物的相互关系等。

(一)细胞质膜与物质流

细胞的跨膜运输(transmembrane transport)是物质流最基本的运输方式,包括了多种被称为运输蛋白的蛋白质的参与。细胞质膜(cytoplasma membrane)又称细胞膜(cell membrane),是微生物细胞的基本结构之一,也是跨膜运输的行使者。细胞质膜是位于细胞壁内侧的一层薄膜(厚度约 7nm),主要由磷脂和蛋白质组成。细胞质膜不仅具有维护细胞内微环境相对稳定的作用,而且具有与外部进行物质交换和运输功能的作用。细胞质膜的物质

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

交换作用与其具有的疏水性（hydrophobicity）以及多种被称为运输蛋白的蛋白质有关，这一特性使其在各种分子跨膜运动过程中起到重要的作用，包括允许水和一些小分子的扩散和营养物质的选择性进入和摄取。

细胞质膜不仅是物质交流（营养物质和代谢产物进出）的通道，而且也是细胞能量和信息交流的门户。目前，对口腔细菌细胞质膜蛋白，包括变异链球菌双组分信号转导系统（two-component signal transduction）的深入研究，有望揭示细胞质膜与物质流关系的本质。

（二）微生物共位群的物质流

在口腔生态系定植着种类复杂的微生物种群，这些微生物群落之间以及与宿主组织细胞之间存在着复杂的代谢活动，包括代谢产物的产生、流动和交换。在一些微生物之间存在密切的营养关系，表现为助生关系或共生关系，这种关系的维系与生态系存在的物质流密切相关。

1. 共位群　在有近千种微生物的口腔生态系中，讨论物质流存在较大的难度，但微生物学家们提出的微生物“共位群”（guild）这一概念，对探讨生态系物质流和动力学的相关性有很大的启示。“共位群”是指在代谢上相关的微生物种群，是研究微生物相互关系的一个基本概念，也将成为物质流讨论中的一个重要概念。

在口腔生态学微生物研究中，学者们发现多种正常微生物之间存在密切的营养关系，一些微生物的生长必须依赖其他微生物提供的营养物质或生长因子，如血链球菌（*Streptococcus sanguis*）给变异链球菌提供必需的生长因子对氨基苯甲酸（para-aminobenzoic acid，PABA），福赛斯坦纳菌（*Tannerella forsythensis*）和牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*）需要具核梭杆菌（*Fusobacterium nucleatum*）提供的N-乙酰胞壁酸（N-acetylmuramic acid）。作者认为微生物共位群之间这种密切的营养关系和代谢物质的传递和利用是口腔生态系中最经典的物质流，与口腔生态系的动力学活动和变化密切相关。

2. 龈下菌斑细菌共位群的物质流　口腔细菌之间有着密切的共生关系，包括营养物质和生长因子的提供和传递。龈下菌斑与口腔牙周炎关系密切，在牙周炎病原菌研究中发现龈下菌斑细菌的种类高达700多种，其中可培养的优势细菌中存在密切的共位群关系。很多种细菌的生长需要同一生境中其他细菌的存在，这也是一些龈下菌斑细菌在纯化培养后死亡，致使次代培养后的菌种检出数量明显低于初代培养的重要原因。Vartoukian等（2012）从牙周炎患者龈下菌斑分离的一种新菌属，因其细菌的良好生长依赖具核梭杆菌的存在（在肉汤培养基中添加具核梭杆菌的超声破碎细胞滤液可明显刺激生长）而被命名为依赖杆菌属（*Fretibacterium*）。图6-1列示了龈下菌斑部分共位群细菌之间的物质流，当然这只是口腔生态系物质流中的冰山一角。

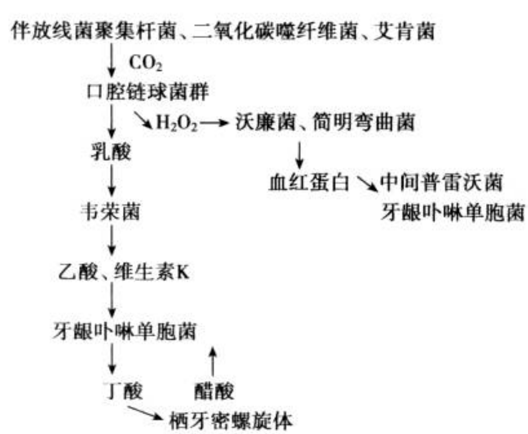


图6-1　龈下菌斑共位群细菌物质流示意图

（三）牙菌斑生物膜的物质流

在口腔微生态系中，微生物群落以

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

生物膜(biofilm)的形式存在。牙菌斑生物膜(plaque biofilm)是口腔微生物在牙面黏附生长形成的有高度组织化的膜状物,由细胞外基质或称胞外聚合物(extracellular polymeric substances)和微生物群落组成。在牙菌斑生物膜内存在复杂和活跃的物质代谢活动,包括糖代谢、蛋白质代谢、碱性物质代谢,这些代谢物质的产生和流动被称为牙菌斑生物膜的物质流。有关菌斑生物膜物质代谢,特别是致龋菌的糖代谢及相关调控机制与其致病性的相关性一直是重要的研究内容。

糖代谢、产碱代谢及其代谢产物的流动是牙菌斑生物膜中最重要的物质流途径,也是与牙菌斑生物膜的致龋力密切相关的代谢途径。大数口腔细菌如唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)、缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)和变异链球菌等能利用其产生的糖基转移酶(如蔗糖基转移酶和果糖基转移酶)将生境中的蔗糖或果糖合成细胞外多糖(exopolysaccharides, EPS),其中水溶性多糖(soluble exopolysaccharides),如 α-1,6-糖苷键葡聚糖具有细胞内多糖的作用,是牙菌斑生物膜内能源和碳源的主要贮存方式。

水解尿素和还原硝酸盐是牙菌斑生物膜最重要的产碱代谢途径,唾液链球菌和内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)产生的尿素酶,可水解唾液和龈沟液中的尿素产生氨和二氧化碳,成为牙菌斑生物膜重要的氮源,并对调节口腔中酸碱平衡起到了重要作用,在生物膜中唾液链球菌的尿素酶活性比在浮游状态高出 130 倍。

牙菌斑生物膜结构中存在由细菌胞外聚合物形成的密集而交织的网状结构,称为基质网(matrix),形成牙菌斑生物膜内高度交联的三维立体结构。基质网结构密布了无数的通道,包括水道、气道和物质通道,这些微小通道是牙菌斑生物膜内细菌之间以及生物膜与外环境之间(如唾液和釉质之间)进行物质交流和转换的重要通道,即牙菌斑生物膜的营养供给和产物排除的重要渠道。在酸性条件下,釉质中的羟磷灰石可被溶解,其钙、磷成分被分散到菌斑生物膜的基质网中,而在唾液中的钙、磷等无机物和氨基酸等有机物则通过菌斑生物膜中的通道相互转换和流动。

三、信息流

在微生物细胞之间以及微生物细胞和宿主细胞之间存在着复杂的通信和对话关系,微生态学家将生态系中存在的信息联络和交流称为信息流。信息流依靠细胞间的通信系统(cell communication system)来完成,细胞间的细胞通信系统又称信息传导系统,由细胞通信介质或细胞通信信号分子传导。信息传导包括信号分子的产生、转运系统、感应识别系统、靶基因调控系统等。口腔生态学者们希望通过对牙菌斑生物膜内微生物的信号传递,包括微生物之间信号传递的特点及其调控机制的探讨,进一步了解口腔生态系的信息流及调控机制。

生态系中信息流包括行为信息、营养信息、化学信息和遗传信息。化学信息的传递与生态系统中微生物个体的生长发育、群落组成和相互关系(共生和促进、制约和排斥)有着密切的关系。

遗传信息传递,又称基因流。基因流是目前最热门的研究领域,揭示了生态系统中各种群内和种群间的行为、相互关系以及宿主致病机制及生命存在的本质。已有的或正在讨论的内容包括细菌遗传物质转移的机制、耐药质粒的传递、毒性和非毒性克隆株表达、调控及基因突变等。目前受到关注的生物信息学(bioinformatics)就是以基因组信息学作为源头和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

基础,即以基因组 DNA 序列信息分析作为基础,寻找基因组序列中代表蛋白质和 RNA 基因的编码区,阐明非编码区信息,归纳整理与基因组遗传信息释放及其调控相关的转录谱和蛋白质谱的数据,从而认识生物体代谢、发育、分化和进化的规律。

(一) 信息传导介质

细胞信息的传导由一个有高度精确性和有效性的传导机制来完成,其中包括细胞通信介质或细胞通信信号分子。在生态系统中多种营养物质(如碳源、氮源、铁离子)以及多种代谢物质和次级代谢产物(如酶、维生素、代谢酸、生长素等)是化学信息传递的通信介质或信号分子。龈沟液中的铁离子浓度不仅对生物膜形成有影响,对牙龈卟啉单胞菌毒性因子牙龈素及白介素Ⅱ的表达有明显的调控作用。弱酸性(pH=6.0)环境,当氮源缺乏、糖浓度升高时,内氏放线菌尿素酶活性的表达明显升高。

(二) 密度感应信号系统

1977 年,科学家在费氏弧菌(一种海洋发光细菌)首次发现和描述了细菌可感应周围环境中种内或种间的细菌细胞密度分子,并以此调整自身群体的密度。这种群体感应现象的发生机制被命名为密度感应信号系统(quorum sensing,QS),又称密度感应通信系统,是细菌间通过分泌信号分子进行通信联系和信息交流的一种主要的信息系统,也是细菌间存在的一种特殊的信号传递机制。细菌细胞内密度信号感应的受体蛋白通过与信号分子的结合被激活,从而调控包括信号分子的合成、毒性克隆的产生及生物膜形成等特定基因表达,包括细菌种内和种间的基因表达。

QS 信号系统也是口腔细菌间最重要的信息流调控机制之一,变异链球菌、牙龈卟啉单胞菌等口腔致龋菌和牙周致病菌的 QS 信号系统在毒性因子产生和生物膜形成中的作用。虽然研究者们在讨论口腔细菌信号传递中作了大量的工作,包括缺陷株的建立和多菌种生物膜的研究等,但在口腔生态系进行 QS 信号系统的研究还存在相当大的难度,对其研究甚少,包括 QS 信号系统对牙菌斑生物膜形成的调控,除 AI-2 信号分子、*luxS* 基因以外的其他信号分子,QS 信号系统信号分子及其受体的其他分子机制以及 QS 系统的干扰和灭活等还待深入探讨。

1. 感应机制　QS 信号系统主要由信号分子和受体蛋白组成,其工作机制:是细菌在生长过程中,不断分泌信号分子,当其达到一定浓度时,细胞内的密度感应受体蛋白与信号分子结合被激活,经激活的受体蛋白可调控细菌的黏附、生物膜的形成和功能、毒性因子的产生和酸耐受性、氧化应激反应等基因的表达。

变链素是变异链球菌产生的主要细菌素,对同一生境的其他口腔链球菌群细菌有抑制作用,变异链球菌 QS 系统可调控变链素的合成和分泌,调控牙菌斑生物膜的稳定性。变异链球菌 QS 信号系统由感受态刺激肽(competence stimulating peptide,CSP)介导,与其相关的基因是 *comC*、*comD*、*comE* 和 *comX*。CPS 信号系统参与变异链球菌酸耐受、生物膜形成和氧化应激基因调控。

2. AHL 信号分子　QS 信号系统的信号分子因能调控自身的合成被称为自体诱导物(autoinducer,AI),AI 是微生物群体效应的关键角色,其广泛存在于革兰阳性和革兰阴性细菌中。

N-酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactones,AHLs)是革兰阴性细菌 QS 信号系统最重要的信号分子,AHLs 信号分子可以自由出入细菌的细胞质膜完成信号转导作用。革兰阳

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

性细菌 QS 信号分子包括：寡肽类(oligopeptide)信号分子，又称自体诱导肽(autoinducer peptide，AIP)信号分子；ABC 转运装置系统(ATP-Binding-Cassette)；双组分感应识别系统(two-component signal transduction system，TCST 系统)。

呋喃酰硼酸二酯(furanosyl borate diester)信号分子，又称 AI-2 信号分子，是革兰阳性细菌和革兰阴性细菌的一个共同的信号分子，在口腔的优势菌群如格氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)、血链球菌、口腔链球菌(*Streptococcus oralis*)、中间普雷沃菌(*Prevotella intermedia*)、具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌均发现 AI-2 信号分子。

AI-2 信号分子途径可调控多种代谢途径，包括毒性因子产生和生物膜形成等病原机制的基因表达等。AI-2 信号分子在格氏链球菌和牙龈卟啉单胞菌的双菌种生物膜形成中具重要作用，并对变异链球菌葡糖基转移酶(glucoxyltransferase，gtf)活性水平产生影响。

3. *luxS* 基因　LuxS 是 QS 系统与信号分子结合的受体蛋白，LuxI 是合成 AHL 的酶，LuxR 能够与信号分子 AHL 结合并被激活的调控因子。*luxS* 基因是受体蛋白 LuxS 的编码基因，也是调控 AI-2 信号分子产生的重要基因。*luxS* 基因广泛存在于口腔的革兰阳性和革兰阴性细菌中，是 QS 信号系统最主要的信号传递和基因调控的执行者。

luxS 基因是近年来口腔细菌 QS 信号系统研究的一个热点，*luxS* 基因缺陷株的构建被用于 QS 信号系统的作用及机制的研究。变异链球菌 *luxS* 基因的缺陷突变株，被发现约占基因组 30% 的基因表达受到影响，涉及该菌的致龋机制如产酸和耐酸反应、氧化应激、细菌素的合成及生物膜形成等多种特性的表达。

luxS 基因调控口腔细菌代谢，对变异链球菌的硫代谢和糖基质的代谢，影响牙龈卟啉单胞菌、伴放线菌聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)的铁代谢等相关基因的表达。牙龈卟啉单胞菌 *luxS* 基因依赖的 QS 信号系统不仅与亚铁的吸收有关，与蛋白水解酶和血凝素蛋白活性调控有关。比较伴放线菌聚集杆菌 *luxS* 基因缺陷突变株与野生株，发现铁代谢、转运与贮存基因和白细胞毒素表达等相关基因的改变。

(三) 耐药质粒

质粒(plasmid)是菌细胞内染色体外的遗传物质，为环形闭合的双股 DNA 分子，具有在细胞内复制、维持和在细胞间转移以及从其他细胞获得遗传信息的作用及功能，包括自发复制细菌某些附加功能的遗传信息(genetic information)，如性菌毛、细菌素、毒素和耐药性等。

细菌对抗生素的耐药性常由质粒携带和介导，称为耐药质粒(resistance plasmid)。质粒可携带多种耐药基因，在同种或不同种类的细菌间传递，由耐药质粒在细菌间传播是获得耐药性形成的主要机制。耐药质粒的传递是口腔生态系基因流的典范。细菌的耐药性分为天然耐药性和获得耐药性，前者为细菌自身具有的对某种抗生素耐药，为细菌的种属特性，故又称固有耐药性；后者因细菌相关 DNA 改变而产生的耐药性，包括染色体突变(chromosome mutation)和耐药质粒(resistance plasmid transmission)的获得。

(四) 生物膜的信息流

生物膜内微生物之间的通信关系和信息交流，对于其适应口腔各种复杂多变的环境刺激(如唾液分泌、酸性 pH、氧化应激等)以及相互作用和生存均至关重要。QS 信号感应系统影响生物膜形成和耐药性的调控，生物膜中存在的多种 QS 信号感应系统信号分子，与生物膜的形成、细菌间的相互集聚、营养物质的交流及特定基因的表达和耐药性相关。呋喃酰硼酸二酯(即 AI-2)信号分子是格氏链球菌生物膜形成必需的信号分子。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

密度信号感应系统可通过调控生物膜的形成和直接参与包括细菌外排泵在内的多种耐药性调控。信号分子在细菌的种内和种间的交流和合作可影响生物膜内细菌生存和毒性克隆表达。牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和伴放线菌聚集杆菌是牙周病的病原菌，常常在龈下菌斑和深牙周袋的龈下非附着菌斑中检出，牙龈卟啉单胞菌分泌的 AI-2 信号分子可刺激具核梭杆菌生物膜的形成，伴放线菌聚集杆菌分泌的 AI-2 信号分子可代偿牙龈卟啉单胞菌 *luxS* 基因缺陷突变株。

第二节 群落行为生态学

群落行为生态学（community behavior ecology）不仅是生态系动力学的表达形式之一，也是生态系动力学的发生机制的影响因素之一。群落行为生态学包括群落的稳定性和多样性、群落的生态演替及对生态系紊乱的反应。

一、群落稳定性和多样性

在正常生理状态下，微生物群落形成相对稳定的定植状态，包括特定生态区内微生物的数量、种类及排列的方式等。牙菌斑生物膜从形成到成熟，其排列有序的三维结构显示了微生物群落的相对稳定性。

群落稳定性（stability）是一个相对的概念，包括了特定生态区内群落组成和分布的稳定性，这种稳定性会因多种因素（包括来自宿主、微生物自身及外环境因素等多种因素）的影响和作用导致群落多样性（community diversity）的产生。

群落多样性是一个复杂的生态学现象，包括了群落组成和分布的多样性，就其定植的生境而论，群落的多样性可出现在不同的生境，也可表现于同一生境中；就其表现形式而论，或为表型的多样性，包括种群数量和组成的多样性，或为基因多样性，包括功能基因的多样性、突变株及新种属的形成等。群落多样性不是简单的个体变化，而是微生物群落通过信号传递系统调控的结果。它们通过信号传递系统调整自身的生理生化特性，乃至功能基因和遗传基因的变化，从而适应不断变化的生态环境。

（一）生物多样性和稳定性

1. 生物多样性 生物多样性（biological diversity 或 biodiversity）概念由美国野生生物学家和保育学家 Ramond F Dasman 于 1968 年首次提出，是 Biology 和 Diversity 的组合。按照《生物多样性公约》的定义，生物多样性是指“所有来源的活的生物体中的变异性，这些来源包括陆地、海洋和其他水生生态系统及其所构成的生态综合体；包括物种内、物种之间和生态系统的多样性。”

生物多样性是自然多样性程度总称，为 3 个级系分类，即基因、物种和生态系统。生态系统的各个生物组织层次主要包括生态系统、群落、种群、个体、器官及基因等。由于同一生物组织层次的不同单元均占有特定的生态位，生态位的时空异质性决定了各个生物组织层次的多样性。生物多样性通常包括遗传多样性、物种多样性和生态系统多样性 3 个组成部分。

遗传多样性（genetic diversity）是生物多样性的重要组成部分。广义的遗传多样性是指地球上生物所携带的各种遗传信息的总和。狭义的遗传多样性主要是指生物种内基因的变化，包括种内显著不同的种群之间以及同一种群内的遗传变异。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

物种多样性(species diversity)是生物分类的基本单位,是指地球上动物、植物、微生物等生物种类的丰富程度。物种多样性包括两个方面,其一是指一定区域内的物种丰富程度,可称为区域物种多样性;其二是指生态学方面的物种分布的均匀程度,可称为生态多样性或群落物种多样性。

生态系统多样性(ecosystem diversity)主要是指地球上生态系统组成、功能的多样性以及各种生态过程的多样性,包括生境的多样性、生物群落和生态过程的多样化等多个方面。

2. 生物稳定性　生物稳定性(biological stability 或 biostability)的定义尚无定论,不同理论对稳定性的定义取决于该群落所表现出来的固有的动力学类型以及其可能遇到的动态干扰的类型。基于热力学原理的概念,稳定性指系统受到外部扰动后保持和恢复其初始状态的能力。

生物稳定性包括恢复力、抵抗力、持久性和变异性等。恢复力(resilience)是描述一个稳定系统在受到扰动后回到原来平衡状态的快慢。抵抗力(resistance)是指系统在受扰动后产生变化的大小。持久性(persistence)是系统受扰动后在产生变化之前所能持续的时间。变异性(variability)是系统受到扰动后种群密度随时间变化的大小。

生物稳定性分为两类,一类是基于系统动力学的稳定性,即把抵抗力和恢复力定义为生态系统对外界干扰的响应;另一类是系统抵抗扰动的能力,将抵抗力、恢复力、持久性和变异性等作为扰动后系统的反应。中国科学院植物研究所的王国宏教授认为,自然界的生物群落都存在着程度不同的外力干扰,对稳定性内涵的两种界定中,前者过于理想化,后者似乎更具合理性,但却没有反映出不同性质扰动下系统响应的内涵。

如果根据扰动的性质和强度,把生态系统区分为受非正常外力干扰和时间尺度上受环境因子正常波动干扰的两类系统可能更具实际意义。基于此,稳定性可理解为对于受非正常外力干扰的系统而言,抵抗力和恢复性是测度其稳定性的主要指标;对于受环境因子正常波动干扰的系统而言,持久性、变异性是衡量系统稳定性的指标。那些能适应环境因子的自然波动,并能保持其自身生存与繁衍的系统就是稳定的生态系统。

生物多样性和稳定性之间的关系一直有争议,一般认为多样性增加了其稳定性。不同的理论结果相互矛盾,而实证研究的结果不一致。研究表明,生态系统的许多特性都会影响其稳定性,包括物种的多样性、物种之间的作用力、食物网络布局以及物种对不同环境变化的敏感性等等。

MacArthur 1955 年首次提出了群落中稳定性与多样性关系的问题,认为在一个群落中对其稳定性起决定性作用的是物种的多少,物种之间的相互作用起补充作用。Charles Elton 支持这一理论,1958 年提出群落越简单越不稳定的论点。Elton 认为,与复杂的群落相比,简单的群落更易受毁灭性的种群波动的影响,抵御外来侵入的能力较弱;而复杂的系统物种多,可以补偿扰动造成的影响,从而保证系统的稳定性。这些结论基于所有的群落都处在易被扰动的环境中,稳定性也仅指一个群落内种类组成和种群大小保持不变。

1973 年,Robert May 采用统计学领域的数学模型揭示多样性与稳定性的关系,他论述了物种数(S)、种间联接(C)以及作用强度(β)对系统由稳定状态变为不稳定状态的过程中所起的作用,满足该不等式[$\beta(SC)^{1/2}<1$]的系统被认为是稳定的系统。作为数学上的常识,多样性不可避免地降低了群落的动力稳定性。其他生态学家运用相似的方法证实了这一理论。May 的特点是将控制论中稳定性的分析方法应用至生命系统,其缺点是没有考虑生态

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

系统中的调节机制。Yodzis 认为，数学模型中所模拟的食物网络链之间的关系看似合理，实则比现实中随机抽取的网络稳定得多。加拿大学者 Kevin Shear McCann 认为，早期多样性与稳定性关系的争论中忽视了一些根本性的因素，2000 年提出种群密度离极端密度越远（越接近平衡密度），稳定性就越高。多样性可以导致稳定性，但形成这种关系的驱动力不是多样性本身，而是群落包含物种或功能群的能力。对整个群落进行完整评价的稳定性的概念应包括所有物种，而不是对单个物种的水平进行评价。

研究生物多样性与生态系统稳定性关系有很多经典实验。如 Naeem 的微生物实验、van de Heijden 的 AMF 实验、Cedar Creek 实验等。这些研究都提出了生态系统内的多样性与群落的稳定性呈正相关性。但这些结论是否适用于总体的生态系统过程尚无定论。由于群落或生态系统的结构复杂性决定了物种多样性的复杂性以及稳定性含义的复杂性，因而其结论的复杂性也在意料之中。现在仍在不断地提出假说推论，然后又不断地否定或修正。随着现代科学技术不断地向前发展，我们对多样性和稳定性之间关系的认识定会不断地深入。

（二）口腔群落多样性

微生物无论是以游离态还是以生物膜方式存在，其群落（communities）方式永远是其定植和生存的基本特点并形成相对稳定的定植状态，从而形成了生态系的相对稳定性。群落是生态系微生物存在的基本形式和组成单位，在代谢上相关的种群被称为共位群（guilds），而具有互补生理作用的各种共位群则构成微生物群落。生态系微生物行为多样性是在讨论个体行为多样性的基础上，着重讨论微生物群落行为的多样性。

口腔是人体最大的微生物栖息地之一，在口腔生态系中定植的微生物种类极其复杂，包括细菌、古细菌、真菌、支原体、病毒和原虫等，无论在同一个体的不同生境，还是在不同个体的同一生境，微生物多样性十分丰富，而在不同年龄、不同生态状况及不同时间段的口腔微生物群落的多样性也有可能存在差异。

1. 种群多样性　种群多样性包含了物种的组成、数量和分布的多样性。口腔生态环境较为复杂，口腔不同部位都有各自的特点，在结构、理化性质上不同，微生物的组成和分布也各具特点并形成明显的多样性。

口腔微生物不仅数量多，而且种群复杂，包括细菌、真菌、病毒、支原体、衣原体和原虫等。最新的口腔核心微生物组（core microbiome）研究结果显示仅细菌的种群就包括了 1 门古菌、12 门细菌，共 179 个属 645 种原核生物，并不断有新的种属被发现和命名，这些研究说明口腔微生物种群的确存在多样性。

微生物组研究中采用丰度（即总检出率）表示微生物物种量的多少，无论是高丰度的成员或是低丰度的成员都有可能在生态系复杂的群落行为表现中作为关键物种。

口腔微生物分布的多样性也很明显，口腔生态环境较为复杂，口腔不同部位都有各自的特点，在结构、理化性质上不同，微生物的组成也各具特点。一定的微生物需要一定的、特殊的生活小区或位点。在同一牙齿的不同部位，因解剖结构及所处生境的不同，其微生物的分布也存在差异，在光滑牙面以需氧和兼性厌氧的球菌为优势菌，如血链球菌、奈瑟菌、放线菌、罗氏菌，而在牙邻面和点隙沟裂厌氧菌的种类则明显增多。

从 127 个健康人舌背的链球菌菌种和丰度的检测结果，仅舌背部链球菌菌种和丰度就存在明显的多样性。有关人口腔微生物种群多样性的详细内容见第四章口腔正常微生物群。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

对口腔微生物种群多样性的认识很大程度上依赖于研究手段，采用常规的培养方法对口腔微生物多样性的研究多集中在口腔微生物种属组成多样性和表型多样性方面。Staley 等认为只有低于 1% 的微生物可以在实验室环境下生长，提示以培养技术为基础研究口腔微生物菌群的复杂性和基因多样性具有严重偏差。

现代生物技术以 DNA 为基础的一系列研究方法，如 16S rRNA 基因技术、高通量指纹技术、宏基因组学技术以及第二代基因测序技术（如 454 测序平台和 Illumina 测序平台），为研究口腔群落多样性的研究提供了最新的研究手段和技术。Conrads 等用 16S rRNA 序列分析检测根管内细菌，并首次在感染根管内检测到福赛斯坦纳菌。Lyons 等用 TaqMan 系统成功地确定了龈下菌斑内的总菌量和牙龈卟啉单胞菌数量。其他学者的定量实验进一步证实，牙周炎患者牙周病原菌的平均量大于正常个体。Banerjee 等使用荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization，FISH）技术检测了龋病患者牙本质内的总菌群后，认为该技术有助于进一步确定龋坏牙本质内全部细菌的分布、丰度和生存能力，更好地理解龋病的病理过程。Sakamoto 等将末端限制性片段长度多态性（terminal restriction fragment length polymorphism，T-RFLP）分析技术用于牙周病患者的菌群分析证实，T-RFLP 分析可以有效评估口腔菌群的多样性及牙周炎疗效。

变性梯度凝胶电泳（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）和温度梯度凝胶电泳（temperature gradient gel electrophoresis，TGGE）技术是基于 16S rRNA 高变区的碱基序列不同来分辨不同的微生物群落。近年来，该技术已广泛应用于微生物群落多样性、复杂微生物群落结构演替规律、微生物种群动态性、重要基因定位、表达及调控的评价。将 PCR-DGGE 技术用于龋病易感性研究，图谱分析无龋和高龋个体的唾液标本中可培养细菌的组成，无龋个体口腔微生物多样性高于高龋组，高龋个体口腔微生物群落中可能部分细菌受到抑制或被取代。

2. 行为多样性　关于生态系微生物群落行为多样性的定义尚待定论，笔者认为行为多样性是生态动力学的重要表现形式和动力学机制之一，其涉及的内容是微生物群落行为方式的多样性，包括：微生物群落演替，微生物群落的共生、助生、竞争与拮抗关系等。

（1）演替：演替（succession）是群落行为生态学最典型的表现形式，也是微生物菌群行为多样性的主要表现形式之一。在生态学中，演替被定义为一个自然群落中物种的组成连续地、单方向地、有顺序地变化，是一个生态系统类型被另一个生态系统类型所取代的过程，通常以宿主的生长期和环境条件变化为基础，并可划分为发展（幼年）期和成熟（顶级）期两个差异显著的演替阶段。当生态系统发展到顶级生态系统时，意味着整个系统演替达到最稳定的时期。

关于演替有整体论和个体论两种观点。以美国生态学家 Odum 为主要代表人物的学者提出的整体论，强调环境的作用，强调系统的整体特征和综合特征，他们认为生态系统演替是有序的、定向的，从而可预见的群落内部控制过程，而且终止于具有内控自调特征的稳定阶段（即顶级）。以 Gleason 为主要代表学者提出个体论，即整体等于其组分之和，系统可以简化或分解到组分水平，最终可根据物理或化学原理加以解释。他们认为，群落只不过是种群动态的总和，因而它的演替并不是有序的或可预见的。

（2）口腔群落演替：微生物群落类型在一定生境、一定时间内，因生态环境改变或在宿主不同发育阶段引起的口腔微生物种群和数量的变化，并转变成另一类型的过程，称为

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

演替。

口腔生态系群落演替最典型的例子是牙菌斑生物膜从形成、发育到成熟和老化的过程，牙菌斑生物膜细菌从少到多，种群和结构从简单到复杂。在早期菌斑中兼性厌氧的球菌（如唾液链球菌、缓症链球菌、血链球菌）是主要群落成分，其结构呈稀疏状，而在成熟菌斑中各种专性厌氧的革兰阳性和革兰阴性厌氧杆菌成为主要的群落成分，其结构变成致密状。

生理性演替：在口腔生态系统中，因生理性因素如牙列的增龄性变化，从新生儿无牙口腔到儿童的乳牙列再到少年时期恒牙列的完整存在，口腔微生物群落不断发生着动态的变化，称为生理性演替（physiological succession）。

伴随宿主和生境的生理性变化产生的微生物群落变化即生理性演替。其主要影响因素是年龄，因为随着宿主的增龄性改变，口腔生态区从新生儿的无牙口腔到牙的逐渐萌出和牙列完整，期间包括乳牙的脱落和恒牙的萌出。在新生儿无牙口腔以唾液链球菌和奈瑟菌为优势菌。幼儿期牙的萌出，在牙面定植的是血链球菌、变异链球菌和丝状杆菌。在少儿期，随着磨牙萌出和恒牙列的建立，口腔生态区中滞留区的增多，如牙邻面间隙、龈沟等给厌氧菌的大量定植提供了有利的生态环境，普雷沃菌属、卟啉单胞菌属、梭杆菌属、放线菌属、真杆菌属等成为口腔的优势菌。在13岁左右少儿的口腔中可检出比例较高的厌氧菌，通常在15岁左右口腔菌群的生理性演替到达顶峰。恒牙完全萌出，口腔解剖结构处于相对恒定的状态，口腔微生物群也达到演替的峰顶，处于一个相对稳定和持续的高峰群落期。在青春期，口腔内定植的微生物数量最多、种类最复杂，唾液细菌数量从幼儿期的10^8～10^{10}CFU/L升高到10^{12}～10^{14}CFU/L，细菌种类超过700多种。厌氧菌的大量定植和数量增加是青春期菌群的另一特点，青春期龈炎的高发病率与这些厌氧菌的增加有关。在青春期和成人口腔中，梭杆菌属、普雷沃菌属、卟啉单胞菌属、二氧化碳噬纤维菌属、螺旋体、消化链球菌属、放线菌属、真杆菌属是最常见的厌氧菌。研究表明，青春期单纯性龈炎、青少年牙周炎及成人牙周炎发病率的增高，与口腔中产黑色素的革兰阴性厌氧杆菌、梭杆菌属、螺旋体的数量明显增加有关。

老年期由于受到牙列松动或丧失、咀嚼功能及唾液分泌功能下降等因素的影响，老年人口腔中微生物群会发生变化，不仅菌群数量有所下降，且种类也有所改变，革兰阴性厌氧杆菌和假丝酵母菌增加是一重要特点。假丝酵母菌增多是Newton氏Ⅱ型和Ⅲ型义齿性口炎的主要病因，而产黑色素厌氧杆菌的增多是老年人牙周炎和冠周炎多发的重要原因。

病理性演替：凡是由于非生理因素（如外环境因素）或病理因素引起的口腔微生物群落类型的变化，如牙外伤、龋病和牙周病，表现为生境中某些细菌的过度生长或减少、优势种群的转换等，称为病理性演替（pathological succession）。

病理性演替主要是以口腔正常菌群为主的演替过程，表现为正常微生物组成和数量的异常变化和易位。这种易位可以是近距离的即在口腔生态区内不同生境中，也可以是远距离的即在口腔生态区外的易位，如龋坏或拔牙患者产生的菌血症，可在细菌性心内膜炎患者血中检出变异链球菌及血链球菌。病理性演替可以是永久的、不可逆的，也可以是暂时的，比如牙周洁刮治术、龋洞的充填等可以缓解或终止这一病理性演替。外伤牙折可因牙髓暴露导致牙髓感染，使原来无菌的髓腔中定植各种兼性厌氧菌和专性厌氧菌；由于卫生状况差导致细菌堆积和厌氧菌过度生长所引发的龈炎或因创伤引起的牙周病原菌的易位导致牙周袋的形成、牙周炎的发生发展；或细菌过度生长，产酸导致牙面脱矿患龋；或拔牙后感染所致

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

干槽症、白假丝酵母菌所致黏膜感染，均为病理性演替。

糖尿病患者口腔中，中间普雷沃菌数量增多，提示全身疾病对口腔细菌可能存在影响。于淼等应用变性梯度凝胶电泳技术，分析了20对不同龋状况母子口腔唾液中微生物群落组成的多样性。结果发现，母子口腔唾液中分别检出42个和48个菌种，其共同菌种为37个，归属于16个菌属。无龋组母子唾液中嗜血菌属的相对数量显著高于高龋组；无龋儿童携带的放线菌属相对数量也多于高龋组，链球菌属、奈瑟菌属低于高龋组；而高龋组母亲口腔微生物中相对数量最多的是乳杆菌属，其次为放线菌属、奈瑟菌属。笔者在一白血病患者血液中检出与其口腔龋蚀材料相同血清型的变异链球菌，提示口腔细菌的易位演替。细菌心内膜炎是口腔细菌易位引起心内膜炎症的又一例子。近期有研究者在唾液中检出与宿主胃内相同血清型的幽门螺杆菌，引起了研究者们的关注。幽门螺杆菌是目前公认的慢性胃炎和十二指肠溃疡的致病菌，这种细菌可能是牙菌斑中幽门螺杆菌的易位所致。牙周炎病原菌的易位已成为引起冠心病又一重要危险因素。

（3）群落的共生：在口腔生态系中，正常微生物之间存在的复杂的共生、竞争与拮抗关系，是口腔生态系微生物群落行为生态学的另一种表现形式，也是生态系动力学的基础。大量的研究证实，口腔生态系微生物群落间的集聚、互养和竞争拮抗，不仅是口腔微生物数量多、种类复杂的重要原因，而且是菌斑生物膜及多样性形成的重要原因。

共生关系（symbiosis）：在生态系中群落的共生关系主要表现为互生（synergism）和共栖（mutualism），互生和共栖又称协同作用或互惠共生，是微生物相互提供生长和定植所需的多种因子，包括黏附因子、营养物质及特殊的生长因子，共聚和互养是口腔群落间互生和助生的主要表现形式。

Gibbons 和 Nyggard 率先提出“细菌间集聚”的概念；McIntire 等提出了细菌“共聚”（coaggregation）的概念；Kolenbrander 则将共聚定义为不同种属细菌表面分子之间的特异性识别。Kolenbrander 指出：几乎所有口腔细菌都参与了共聚，由共聚相关性分子介导，仅存在于特定的共聚伙伴之间并结合牢固；一些细菌在共聚中可起到黏接桥的作用，被称为共聚桥（coaggregation bridging），细菌通过共聚桥形成有序的排列。牙菌斑生物膜谷穗状和瓶刷状结构就是口腔细菌相互集聚的典型例子，细菌之间的共聚在口腔细菌的定植和牙菌斑生物膜的形成和成熟过程中起到了重要的作用。

普雷沃菌与放线菌、龋齿罗氏菌、血链球菌之间均存在共聚作用，其中栖牙普雷沃菌、洛氏普雷沃菌、口普雷沃菌与衣氏放线菌之间有很强的共聚作用，洛氏普雷沃菌可作为共聚桥介导无共聚作用的衣氏放线菌和血链球菌形成共聚，促进这些口腔细菌在口腔的黏附和定植。具核梭杆菌（*F. nucleatum*）形成的网状结构将牙龈卟啉单胞菌和福赛斯坦纳菌包裹于其中，明显地促进了这两种细菌在龈下非附着菌斑和感染根管的定植和致病。被称为共聚相关性生物分子的细菌表面成分有菌毛、外膜蛋白及碳水化合物，这些共聚相关性生物分子能特异性识别其他微生物表面的相关物质，从而介导共聚。黏性放线菌的Ⅱ型菌毛具有植物血凝素作用，并带有一种对半乳糖残基特异性敏感的蛋白质，血链球菌细胞壁多糖中含有半乳糖；Ⅱ型菌毛可与血链球菌表面的特异性碳水化合物决定簇结合，形成黏性放线菌与血链球菌的种间共聚反应，同时介导这些放线菌对上皮细胞的附着。中间密螺旋体（*T. intermedia*）ATCC700273 菌株与牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 和 381 菌株之间的共聚，是通过前者外膜相对分子质量（Mr）为 3.7×10^4 的纤毛结合蛋白与后者的菌毛介导；微小消化

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

链球菌则通过表面的碳水化合物介导与具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌产生共聚；格氏链球菌(*S. gordonii*)DLI 的相对分子质量为 1×10^5 的表面蛋白介导其与属内细菌的共聚。

互养(syntrophism)也是口腔生态系细菌间共生关系最常见的形式，在本章第一节有关物质流的内容中，提到了口腔细菌间密切的营养关系。研究者们发现变异链球菌在牙面的定植要求血链球菌提供的对氨基苯甲酸(PABA)，而福赛斯坦纳菌与具核梭杆菌混合培养产生"卫星现象"，是具核梭杆菌产生的 N-乙酰胞壁酸(N-acetymuranicacid)能明显地促进福赛斯坦纳菌生长所致。从牙周炎患者龈下菌斑分离和命名的新菌属——依赖杆菌属(*Fretibacterium*)的命名也是源于该菌属细菌在琼脂和肉汤培养基的良好生长必须依赖具核梭杆菌的存在。互养菌属(*Synergistes*)被发现在龈下菌斑和感染根管中有高检出率。

(4) 竞争拮抗关系：竞争拮抗关系(competition antagonistic relation)是微生物相互之间存在的，包含生态空间、营养物争夺及拮抗的一种负相关关系，也是影响特定生态区域内正常微生物数量和组成，维持生态环境平衡的重要因素。

竞争是微生物在同一生态空间中，为争夺生态位点、营养物、能源及生长因子的一种生态学关系。竞争关系可以是竞争排斥，也可以是竞争共处，在原籍菌和外籍菌之间多存在竞争排斥关系，而原籍菌之间则多存在竞争共处关系。对生态位点争夺的能力与细菌的黏结素和特异性受体有关，而对营养物、生长因子的争夺则主要存在于共位群，如牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌等产黑色素的革兰阴性厌氧杆菌对栖牙密螺旋体产生的醋酸的需求与争夺以及牙龈卟啉单胞菌和福赛斯拟杆菌对具核梭杆菌产生的 N-乙酰胞壁酸的需求与争夺。奈瑟菌合成的支链淀粉和呋喃果聚糖则是口腔链球菌与乳杆菌需要的生长物质。

口腔细菌之间的拮抗关系讨论较多的是细菌素及细菌素样物质。细菌素及细菌素样物质是由细菌产生的一类杀菌力较强的蛋白质或蛋白质与糖或脂的复合物的统称。细菌素的作用有一定的特异性，其作用机制是敏感菌株的菌细胞外膜具有特异性细菌素受体，细菌素进入菌细胞内抑制或阻断菌细胞的蛋白合成而导致细菌死亡，或影响细菌的 DNA 代谢作用，抑制或拮抗细菌的生长或存活。血链素(sanguicin)是血液链球菌产生的一种细菌素，对牙龈卟啉单胞菌、伴放线菌聚集杆菌、中间普雷沃菌、具核梭杆菌、二氧化碳噬纤维菌均有明显抗菌作用。变链素(mutacin)是变异链球菌血清型 c 型和 e 型产生的细菌素。变链素不仅具有抑制其他一些细菌的作用，而且可影响牙菌斑的形成及发育，加快牙菌斑的生成速度。口腔中定植着大量的产黑色素的革兰阴性厌氧杆菌，如牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌以及多种产黑色素的普雷沃菌菌种，它们均能产生一种细菌素样物质——黑色素菌素(melanin)，不仅能抑制其他不产黑色素的普雷沃菌和二氧化碳噬纤维菌、具核梭杆菌等革兰阴性无芽胞厌氧杆菌，还能抑制口腔链球菌群和唾液链球菌群细菌的生长。

二、群落对紊乱的反应

紊乱(disorder)是生态系常见的表现形式，也是生态系对来自内部或外界异常影响的反应，是生态系动态变化的运行规律。菌落对紊乱反应的行为表现常常是暂时性的，表现为数量的增多或减少，或为种群的变化，最后恢复正常的平衡状态。如果菌落对紊乱反应的行为表现为不可逆转的，则表现为原有种群组合的破坏而形成失调状态。

(一) 干扰的定义

干扰或者扰动(disturbance)是自然界的普遍现象。就其字面含义而言，是指正常过程中

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的打扰或妨碍导致平静状态的中断。生物群落经受外界各种各样干扰及个体自身的干扰，从而使其组成结构在时间和空间上不断产生变化。了解生态系统怎样对群落层面的扰动做出反应是生态学中的一个重要目标。近代生态学家们认为干扰是一种有意义的生态现象，它引起了群落的非平衡性，强调了干扰在群落结构和动态中的作用。生态系统的反应是各不相同的：既可以是所有物种同荣同衰，也可以是总生物量保持不变而个别物种繁荣或消失。Timothy Keitt 对扰动效应进行了 17 年的观测研究，其研究中所采用的扰动是对整个一个湖泊进行实验性酸化。令人吃惊的是，这个湖泊生态系统在受到扰动时变得更为有序了，浮游生物群落从似乎随机的无序状态变成在动态上具有很强的同步性。物种的季节性在决定生态系统反应中是一个主要因素。

研究表明，中等程度的干扰能增加群落的生物多样性，中等程度的干扰频率才能维持高多样性，如果间隔期太长，竞争作用达到排斥别种的程度，多样性也不会很高；反之，若干扰过于频繁，则先锋种不能发展到演替中期，从而保持较低的多样性。Sausa 对底质为砾石的潮间带进行的研究也证明了该理论。潮间带常受波浪干扰，较小的砾石比较容易受波浪冲击而移动，因此，砾石的大小可作为受干扰频率的指标。Sausa 通过刮掉砾石表面的生物，为海藻的再植提供了基底。结果发现，较小的砾石只能支持群落演替早期出现的绿藻石莼和藤壶，平均每块砾石 1.7 种；大砾石很少因波浪干扰而移动，其优势藻类是演替后期出现的红藻类杉藻，平均 2.5 种；中等大小的砾石支持最多的藻类，包括演替中期出现的红藻。证明藻类多样性的差异取决于抗波浪干扰造成的砾石移动的稳定性大小，即移动频繁的小砾石和很少移动的大砾石其藻类多样性都小于中等大小的砾石。

由于干扰而使连续的群落断层是非常普遍的现象，如森林中的断层可能由大风、雷电、砍伐、火烧等引起，草食群落的干扰包括放牧、动物挖掘等。干扰造成群落的扰动以后，有的在没有连续干扰的情况下，会逐渐地恢复，但断层也可能被周围群落的任何一个种侵入和占据，并发展为优势种，哪一种是优胜者完全取决于随机因素，即抽彩式竞争。有些群落所形成的断层对物种更替是可预测的、有规律的。新断层常常被扩散能力强的一个或几个先锋物种所入侵。由于它们的活动改变了条件，促进了演替中期种的入侵，最后为顶级种所取代。在此情况下，多样性开始降低。其次与抽彩式竞争不同的是，小演替一般都有许多建群种，而抽彩式竞争只有一个建群种。

干扰理论对应用领域有重要价值，要保持多样性，就不能简单地排除干扰。1992 年，孙儒泳提出，干扰可能是产生多样性的最有力的手段之一，冰河期反复多次干扰，大陆的多次断开和岛屿的形成，现在看来都是对物种形成和增加生物多样性的重要动因。同样，群落中不断出现断层、新的演替、斑块状镶等，都可能是维持和产生生态多样性的有力手段。

（二）口腔微生物群落的干扰因素

在健康的口腔生态区内，正常微生物群落在不同年龄、不同发育阶段，甚至每一天的不同时间都可能会受到扰动。扰动包括宿主因素、微生物因素及其他因素。

1. 宿主因素　宿主生理功能的变化对口腔生态平衡的扰动，包括宿主的增龄引起的口腔组织器官及口腔生理功能的变化；从婴儿无牙口腔到牙的萌出、牙列的完整，及至中老年期牙的丧失、唾液分泌的减少等，都可能使口腔原有的生态平衡被破坏。此外，还包括影响宿主生理功能的其他因素如个人的嗜好（如吸烟、嗜好蔗糖食品等）、口腔卫生习惯、免疫、遗传、激素分泌等。宿主生理功能对口腔生态平衡的影响通常是暂时性的，并以建立新的口腔

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

生态平衡为其特征。

宿主病理改变对口腔生态平衡的影响。包括口腔感染疾患的发生，如牙体牙髓病、牙周病、口腔黏膜病、外伤、颌面外科牙源性感染及其他一些全身性疾患，如白血病、糖尿病、遗传性疾病（如掌趾综合征）和医源性治疗的并发症，如拔牙后感染、头颈部放疗及癌症化疗患者唾液腺的破坏或功能下降所致的干燥综合征等，这些病理改变对口腔生态平衡的影响是很明显的，所致的生态平衡失调常是不可逆的。当然，一些治疗措施也可能使口腔重建新的生态平衡，如龋洞的充填、牙周炎的洁刮治及药物治疗措施等。评价扰动对口腔生态平衡的影响从微生物的定位、定性和定量指标三个方面进行。在不同生态空间（生境、生态位点）都有相对独立的评价标准，唾液生境的微生物群不同于龈沟生境或牙面、舌、颊黏膜等生境的微生物群。

2. 微生物的相互作用　在一个生态系统中，微生物种类越多，越易保持平衡。当环境变化时，自我调控机制（包括微生物间相互作用）即发挥作用使其回复平衡。牙菌斑生物膜中各类微生物彼此接近，必然产生相互作用。这些相互作用对一种或几种微生物是有益的。而对另外一些则起相反作用。

牙菌斑生物膜细菌代谢可产生影响其他微生物生长的因素，包括特殊、必需营养物质的耗竭及毒性、抑制性产物的大量堆积。这些代谢产物也将引起牙菌斑生物膜内出现水平向和垂直向的分层变化，这种微生物的多相性有利于细菌间的共生。即同一生态位点的细菌彼此不竞争。大多数离体实验证实了这种相互作用，并推测在体内的情况与此类似，但这种相互作用在维持牙菌斑微生态平衡有意义的体内实验数据极少。实验模型系统，如人工口腔、连续培养和限菌性动物实验研究在研究相互作用方面尤为重要。

营养竞争是决定牙菌斑生物膜中特殊细菌比例的最基本因素。细菌生长必需的大多数营养物质是有限的，因而常驻菌的生长主要依靠内源性的营养物质。动物实验表明宿主利用的食物和食物组成对牙面上链球菌和放线菌的生长速度不会产生明显的影响。牙菌斑生物膜微生态系统可产生一系列的蛋白酶和胞外糖苷酶，表明碳、氧主要来源于唾液蛋白和糖蛋白，特别是黏蛋白的降解。个别菌拥有不同但相互重叠的酶活性，当它们共同存在时，可增强对糖蛋白的降解。这种酶活性互补现象已在龈下菌斑人血清培养中发现。细菌经过这种方式可将对营养物质的直接竞争转变为协同分解。类似的方式还出现在以下两种情况中：①形成牙菌斑生物膜基质的胞外多糖的代谢；②口腔链球菌对唾液蛋白的共同利用。连续混合培养和限菌动物实验研究指出，对个别氨基酸、肽、碳水化合物的争夺明显影响着细菌的最终组成。牙菌斑生物膜中不同种类的细菌长期共存直接证明了单一营养物质无法限制所有细菌的生长。细菌尽可能采取变通的代谢途径避免直接竞争以获得生存。

对必需营养物质的竞争是维护牙菌斑微生态平衡的主要因素，但细菌间的次级喂养，即某种细菌的代谢产物供其他细菌的生长所需也起着一定的作用。韦荣菌属可利用乳酸，将乳酸转化成酸性较弱的醋酸、丙酸，可能降低菌斑的致龋力。其他细菌包括奈瑟菌属、真杆菌属、链球菌属等也可在一定程度上利用乳酸。已发现了牙菌斑生物膜和细菌间一系列的营养相互关系，其中一个重要的特点是所有参与者均从中受益。发酵产物的堆积对细胞的代谢将产生抑制作用，其他细菌通过对这些产物的再利用而持续清除了该类物质，使产生菌的能量得到补充，因而代谢活动增强。

拮抗作用也是决定微生态系统中细菌组成的一个重要因素。大多数口腔链球菌、产酸

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

类拟杆菌、伴放线菌聚集杆菌等均可产生细菌素和细菌素样物质。一些链球菌素具有广谱杀菌活性，如针对多种革兰阳性菌，特别是放线菌。限菌动物实验表明产细菌素的细菌在定植中居有利地位，该实验是将具有产细菌素活性的变异链球菌和对细菌素敏感的黏性放线菌一同植入限菌动物口内。牙菌斑生物膜产生的其他抑制性物质包括有机酸、H_2O_2、酶类。由碳水化合物代谢所致的低 pH 环境也对微生态系统的结构产生重要影响。抑制性物质的产生并非意味着敏感菌被完全清除，牙菌斑生物膜内不同微生物群落的存在使彼此间不相容的细菌在同一生态位点生存。在有营养竞争的环境中，抑制性物质的产生可能是弱竞争力细菌得以生存的原因（负营养反馈）。

细菌间的拮抗作用也是外源性细菌难以定植于口腔内的原因。一般认为抑制性因子仅产生于相互竞争的内源性细菌间，但也有例外，如唾液链球菌能产生一种抑制外源性致病 A 族链球菌在口腔定植的抗生素，但 A 族链球菌又反过来抑制唾液链球菌的定植。在无 A 族链球菌定植的儿童咽喉部，唾液链球菌的检出率明显增高。

3. 免疫因子作用　免疫因素也是扰动微生态平衡的因素之一。对各类免疫缺陷患者的研究发现，宿主特异性防御功能在维护微生态平衡中起重要作用。虽然原发性免疫缺陷病极少，但继发性的较为常见，可由一些外因（如药物、感染或营养不良等）引起。免疫缺陷患者对机会感染具有较高的易感性，且感染程度与免疫缺陷程度相关。SIgA 缺陷的儿童很可能感染流感嗜血菌、肺炎球菌，而免疫功能障碍者可能感染金黄色葡萄球菌、假丝酵母菌等的几率增高。这些患者也常发生病毒感染。老年患者，特别是全身衰竭者，其细胞免疫功能下降，易继发假丝酵母菌性口炎，AIDS 患者也易继发感染。而中性粒细胞功能缺陷者易患严重的牙周病。总之，上述研究表明免疫功能缺陷者，口腔易发生外源性微生物的定植。

4. 其他因素　其他（非免疫）因素也可能扰动口腔微生态平衡。宿主非特异性防御功能的缺陷对于牙菌斑生物膜微生态的影响目前尚不清楚。然而，在口干症或严重的 Sjögren 综合征或头颈部恶性肿瘤放疗后的患者中，变异链球菌、乳杆菌等耐酸菌增加，唾液链球菌、奈瑟菌、韦荣菌等减少。口干症患者假丝酵母菌和金黄色葡萄球菌数也较高。这些均由于唾液缓冲能力下降所致，而非其抗微生物性质的丧失。

在牙菌斑生物膜微生态中，碳水化合物代谢所致的 pH 是决定生态平衡的一个重要因素。虽然有很多细菌能造成低 pH 环境，但极少能在此环境下生存。各项活体、离体研究发现，低 pH 可破坏牙菌斑生物膜的生态平衡，导致牙菌斑生物膜中变异链球菌、乳杆菌和韦荣菌占优势，相应的血链球菌、专性厌氧的酸敏感菌减少，龋坏易发生。同样，龈下菌斑中的牙周致病菌，在生长或摄入血清时数量增加。

女性性激素增加可干扰微生态平衡。据报道，在妊娠 4～6 个月时，中间普雷沃菌数量明显增加，原因是血清中雌二醇和黄体酮水平高，满足了该菌对维生素 K 的需求。与此类似，口服避孕药的妇女，牙菌斑生物膜中拟杆菌可升高 16 倍。

引起微生态失调的最典型因素是抗生素。抗菌治疗引起口腔敏感菌迅速减少，并出现耐药菌或异源菌（包括假丝酵母菌、肠杆菌等）的定植。假设抗生素不会抑制宿主的防御功能，那么上述观察结果则表明内源性微生态体系本身就是重要的宿主防御因素之一。宿主特异、非特异性防御功能有助于维护牙菌斑微生态平衡，共同阻止异源菌的定居和条件致病菌对宿主的侵袭。目前，含抗菌物质的漱口水和牙粉已得到广泛使用，但应注意合理使用，避免造成口腔微生态平衡失调。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第三节　群落遗传生态学

群落遗传生态学(community genetics)主要指优势种和关键种种内遗传变异的作用,进而影响到依赖它们而存在的物种、群落组织和生态系的动态平衡。

一、基因多样性

微生物细胞遗传信息的复制、变异、重组和转化形成了基因多样性,在同种细菌中可能存在多个基因型。根据菌毛编码基因 *fimA* 开放阅读框架(open reading frame,ORF)核苷酸序列的差异,牙龈卟啉单胞菌的 *fimA* 基因被分为7型(Ⅰ～Ⅶ)。

生物膜中的细菌可以通过水平基因转移进行通信。感受态刺激肽(competence-stimulating peptide,CSP)等信号分子能显著增加生物膜中的受体细胞获取DNA。Roberts等报道了在体外生物膜模型中编码耐四环素的共轭转座子的转移。体内试验发现鼻咽部缓症链球菌、口腔链球菌和肺炎链球菌中存在耐青霉素基因转移。目前研究证实生物膜能吸纳可移动性基因和其他物质,从而成为"基因池"。

牙菌斑生物膜的生长能直接或者间接地影响细菌的基因表达。生物膜中细菌表型的改变主要是受微环境的影响(如蔗糖浓度、pH等),而不是黏附本身。与游离细菌相似的表面相关反应也存在于生物膜中的细菌,但是,由于生物膜的特殊性,细菌基因表达的调控与游离细菌存在着差异。格氏链球菌接触唾液后可以诱导编码能黏附到唾液糖蛋白的 *sspA/B* 和与放线菌共同黏附的基因。变异链球菌黏附后,一些参与包括蛋白质折叠和分泌、氨基酸和脂肪酸的生物合成以及细胞分裂等的蛋白上调。生物膜中还有一些目前未知功能的蛋白表达。同样,生物膜中变异链球菌与葡聚糖(*gtfBC*)和果糖(*ftf*)合成相关的基因调节也与游离细菌存在着不同。早期生物膜生长(48小时)对 *gtf* 与 *ftf* 影响较小,在后期生长中(7天),*gtf* 基因表达有明显上调,而 *ftf* 基因表达则受到抑制。

二、物种形成

生态学家将物种形成(speciation)纳入生态系动力学讨论的范畴,事实上,物种形成是生态系动力学的另一种表现形式,与生物体的多样性(包括种群多样性、生态多样性和遗传多样性)密切相关。物种形成又称种化,是生物分类的基本单元,是生物演化的一个过程,从一个种内产生出另一个新种的过程;物种形成也被视为生物繁殖和进化的基本单元,是具有一定形态和生理特征以及一定自然分布区的生物类群。

有关口腔生态系物种形成的内容尚待讨论,其中包括口腔生态系中新种属的发现和命名,及微生物群落的遗传多样性。目前认为微生物群体的结构和组成在两个层面反映了自然选择的结果:一是微生物层面,其生长方式(例如生长速率和培养基的利用方式等)影响到特定细菌能否在群体竞争中生存;另外一个层面是宿主层面,宿主的饮食习惯、口腔卫生保健、社会经济地位等诸多因素均可影响微生物群体的结构和组成。

微生物能与宿主共同进化,在保持宿主健康中起到重要作用。这种共同进化被认为在生物膜的生长过程中有多种作用,也影响着微生物群体的物种形成。宿主-微生物相互影响存在着个体差异,因此不同个体会存在着"指纹"般微生物群体。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

牙菌斑生物膜中大约占50%的细菌目前还无法在体外分离培养。基于核苷酸序列分析的分子技术已经对牙菌斑中的细菌种类进行了分析,并鉴别出了大量新的类群。细菌以生物膜的形式存在导致了已有种类的更多的细分。同时,对细菌的分类也可更精确地分为生物型、基因型和其他分组,这样更有利于流行病学的研究以及一些与疾病相关的特定克隆类型的研究。口腔中不断有新种属的发现和命名,其中就包括了原来被命名为基因型的菌株,原来被命名为内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)基因型1、2和WVA963的菌株,近期分别被命名为放线菌新种:口腔放线菌(*Actinomyces oris*)和约翰森放线菌(*Actinomyces johnsonii*)。

第四节 口腔生态系的平衡与失调

生态平衡(ecological balance)和生态失调(dysbiosis)是生态学的核心问题,也是生态系动力学中群落行为的表现形式和结果。在生态系中,平衡和失调是一动态的生理变化的过程,与生态系群落行为密切相关,微生物群落的易位引起的数量和组成的异常是生态失调的主要表现形式。

一、基本概念

(一) 生态平衡

生态平衡是生态系统通过发育和调节所达到的一种稳定状况,包括结构和功能上的稳定、能量输入和输出上的稳定,符合能量流动规律的金字塔形的营养层次,且在外来干扰下能通过自我调节(或人为控制)恢复到稳定状态。当外来干扰超出生态系统自身调节能力而不能恢复到原初状态称为生态失调或生态平衡的破坏。因为能量流动和物质循环不断进行,生物个体也在不断更新。自然条件下,生态系统总是朝着种类多样化、结构复杂化和功能完善化的方向发展,直到使生态系统达到成熟的最稳定状态为止。

每一个生态系统都有其自身一定的组成、结构及其进化、演替规律,并在某个时期内,生态系统可保持相对稳定的状态和性质,即生态系统的动态平衡。生态平衡总是与特定生态系统中的生物群落相联系。所以,生态平衡是一个动态生理过程中的相对平衡,是一个必须明确时间、生境等条件的具体概念,与生态系统的演替及其演替阶段密切相关。从另一个角度看,平衡就是某个主体与其环境的综合协调。所以,生命的各个层次都涉及生态平衡的问题。凡是可以按自然的演替规律正常发展的生态系统都可以认为是平衡的,而并非只有群落演替到顶级时才是生态系统的平衡状态。即使群落发育到顶极阶段,演替仍在继续进行,只是持续时间更久、形式更加复杂而已。因此,生态平衡首先是动态的,其表述应该反映不同层次、不同发育期的区别。各类生态系统或同一生态系统的不同发育阶段,在无人为严重破坏的条件下,只要与其空间条件要素相适应,系统内各组分得以正常发展,各功能得以正常进行,系统发育过程和趋势正常,这样的生态系统就可称为生态平衡的系统。生态系统之所以能够维持相对稳定或动态平衡,是由于生态学的基本规律决定的。这些规律包括:相互依存与相互制约规律、物质输入输出的动态平衡规律、生物与环境相互适应与补偿的协同进化规律、环境资源的有效极限规律,即作为生物赖以生存的各种环境资源,在质量、数量、空间和时间等方面,在一定条件下都是有限的,不可能无限制地供给,因而任何生态系统的生物生产力通常都有一个大致的上限。当外界干扰超过生态系统的忍耐极限时,生态系统就

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

会被损伤、破坏，以致瓦解。

（二）生态失调

生态失调是生态系统受到环境因素影响所产生的紊乱状态，是生态平衡的相反面。早在1920年，德国微生物学家Scheunert就将肠道菌群的紊乱称作生态失调（dysbiosis），事实上，他所称的生态失调只能称为肠道菌群失调，即肠道生态系的菌群失调，而人体生态失调包括了菌群的失调、生态环境的失调以及定植菌群与宿主之间，细菌-宿主这个统一体与外环境的失调，因此这是一个更为复杂的失调状态，各种因素间又是相互影响的。当外界压力（自然或人为）超过了生态系统的调节能力或补偿功能后，都会导致其结构破坏、功能受阻，正常的生态关系被打乱、反馈自控能力下降，甚至不能自我修复，使整个生态系统衰退或崩溃，即生态平衡的失调。生态平衡失调的基本标志可以从结构和功能两方面度量。从结构上看，失衡就是生态系统出现了缺损或变异。当外部干扰巨大时，可造成生态系统一个或几个组分的缺损而出现一级结构的不完整。从功能上看，失衡即能量流动在系统内的某一个营养层次上受阻或物质循环正常途径的中断。

（三）调节机制

生态系统平衡的调节机制主要是通过系统的反馈机制和稳定性机制实现的。因为开放系统具有调节其功能的反馈机制（feedback mechanism），即当生态系统中某一成分发生变化时，它必然会引起其他成分出现一系列的相应变化，这些变化最终又反过来影响最初发生变化的那种成分，这个过程称反馈。反馈包括负反馈（negative feedback）和正反馈（positive feedback）两种类型。其中负反馈的作用是能够使生态系统达到和保持平衡或稳定，结果是抑制和减弱最初发生变化的那种成分所发生的变化；而正反馈的作用是使生态系统中某一成分的变化所引起的其他一系列变化，加速最初发生变化的成分所发生的变化。另一调节机制是生态系统的稳定性。一般情况下，生物多样性越丰富，能量流动和物质循环的途径越复杂，生态系统的自我调节能力越强，生态系统越稳定。多样性贫乏的生态系统，因含有生物种类少、营养结构简单、系统自动调节功能低下，所以，当环境条件发生改变时，将导致生物种群出现较大变化。生态系统中的生物多样性增加，使营养网上具有更多的环节和大量功能丰富的有机体。生物群落的复杂性越大，所具有的自我调节能力也越大。但是，一个生态系统的调节能力再强，也是有一定限度的；超出了这个限度，调节就不再起作用，生态平衡就会遭到破坏。不使生态系统丧失调节能力或未超过其恢复力的外干扰及破坏作用的强度称之为"生态平衡阈值"（ecological equilibrium threshold limit）。阈值的大小与生态系统的类型有关，另外还与外干扰因素的性质、方式及作用持续时间等因素密切相关。

二、口腔生态平衡和失调

对人体来说，生态平衡是一生理过程，是宿主在不同年龄、不同发育阶段、不同部位（生境）的生理平衡状态，也是机体的健康状态。口腔的生态平衡和生态失调与微生物、宿主的免疫力等有关。

（一）口腔生态平衡

口腔生态系的解剖结构即生境的组成、性质和影响因素等十分复杂，微生物在各个特定区域的定植、生长繁殖和代谢因而也存在千差万别。口腔微生物组的研究发现口腔每个生

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

态区细菌的种类、丰度以及相互作用的方式均不相同(详见第二章)。口腔生态平衡指在一定时间内口腔生态系结构、功能以及微生物群落的相对稳定状态,是口腔微生物相互之间以及微生物与宿主(口腔)生理功能高度统一的平衡状态。这种生理性组合状态是在人类进化过程中,微生物与宿主免疫系统的长期应答反应和微生物种群之间的共生、竞争拮抗关系的发展中建立而来的生理性组合状态。健康无病口腔是口腔生态平衡的重要表现形式。在健康口腔中,其结构和功能以及微生物的组成成分和群落行为表现均处于相对稳定的状态并沿着正常的生理演替次序进行着动态变化。

(二) 口腔生态失衡

口腔生态失调包括了口腔常驻微生物相互之间以及这些微生物与宿主口腔之间生理性组合状态的破坏而出现的异常状态,即从口腔的健康状态到病理性状态的产生和存在。口腔生态失调是口腔生态平衡状态的相反面,表现为在特定生境中核心口腔微生物组的组成和数量的异常变化以及口腔疾病的发生如牙面的龋蚀、牙周的炎症、肿瘤等。口腔的生态失调可能通过治疗处理恢复正常的平衡状态或重新建立一新的生态平衡状态。

(三) 评价标准

目前,对口腔生态平衡和失调的评价尚缺乏统一的标准,根据口腔生态平衡和生态失调的定义,并借鉴和参照微生态学家们关于人体生态学生态平衡和生态失调的有关分类方法,我们提出口腔生态平衡和失调的评价标准可通过宿主口腔的临床检查和实验室的微生物检查来完成,即包括宿主标准和微生物标准。

1. 生态平衡的评价标准

(1) 宿主标准:口腔生态平衡的宿主评价标准是健康的口腔,即无龋患、无牙周炎及其他口腔疾患,相关的标准包括临床检查的牙的龋失补牙数(decayed-missing-filled tooth,DMFT)、龋失补牙面(decay missing filling surface,DMFS)、牙菌斑指数,牙周临床的龈炎指数、出血指数、龈附着水平等,以及实验室的唾液流速、pH、口臭味等。在宿主标准的标价中必须结合宿主的增龄性变化即不同发育期的生理性特点和因生理性波动引起的生态平衡的动态变化或暂时性生态紊乱或失调。此外,在宿主评价标准中,还应考虑宿主个体间存在的差异,包括种族、地域等。

(2) 微生物标准:口腔微生物在健康的口腔生态区内不同生境及生态位点均有其相应的组成分布和数量,即核心微生物群(core microbiome)。这一相对恒定的正常微生物群落在不同年龄、不同发育阶段,甚至每一天的不同时间(早、中、晚进餐前后,口腔卫生措施实施前后等)都可能有其特定的生态平衡状态,要评价口腔生态平衡的微生物标准首先必须确定由口腔生理性波动引起的、口腔微生物处于生理性演替时的动态平衡状态。微生物的定位、定性和定量指标是口腔生态平衡评价标准的三个方面。

在不同生态空间(生境、生态位点)都有相对独立的生态平衡特征,即评价标准。唾液生境的微生物群不同于龈沟生境或牙面、舌、颊黏膜等生境的微生物群,口腔生态平衡的微生物评价标准首要的是确立定位标准。从理论上讲,口腔生态区定位界线的划分可依据口腔解剖结构而定,但在实验检测中的定位,特别是生态位点的准确定位,仍存在一定的难度,还待进行讨论。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

由于口腔微生物的数量多、种类复杂，其中占优势的厌氧菌中还包括一些分离培养较难的细菌，如福赛斯坦纳菌、口腔螺旋体等，所以在定性标准方面也待探讨。在方法上，除了常规的鉴定方法，还应包括代谢酸、气体等产物分析以及分子生物学鉴定技术。定量标准是指一定生境内微生物的数量，通常用生境内标本的重量（每克牙菌斑）或体积（每毫升唾液或龈沟液）或面积（每平方厘米舌黏膜或颊黏膜）作为计量的基础，每克或每毫升或每平方厘米标本中细菌的数量（菌落形成单位，CFU）作为口腔细菌的定量的计量方法。在一些生态位点，由于标本量极微（如牙齿的沟裂菌斑），给细菌的定量检查带来一定的困难或定量的准确性误差较大。常规的培养法可采用优势细菌（predominant bacteria）的百分组成比作为定量标准的计量方法。优势菌的百分组成比在评价口腔生态区或其生境、生态位点的细菌生态平衡上已成为一种有意义的定量标准，即各生境或生态位点可培养口腔优势细菌的组成分布（%）。在处于生态平衡状态的健康口腔，链球菌属是优势菌群，而在不同生境，如颊黏膜则以嗜血菌属为优势菌群，龈上菌斑则为放线菌属，龈下菌斑（低氧状态）的优势菌群是普雷沃菌属，其百分组成比较高，其他检出率较高的有具核梭杆菌、二氧化碳噬纤维菌、牙龈卟啉单胞菌、消化链球菌、真杆菌。一种以环境样品中所有微生物群体基因组为研究对象、以功能基因筛选和测序分析为研究手段的元基因组学（metagenomics）技术，则用丰度（abundance）这一概念来表示微生物的数量的多少。专家们指出微生物种群丰度的高低并不是单一的评价标准，在考虑微生物的评价标准时还应注意：①微生物的定位、定性和定量标准是微生物评价标准的三个重要方面。在进行微生物定位、定性和定量评价时，首先应确定年龄段或不同发育期和采样的时间（如口腔细菌样本的采集常常定在起床时、刷牙前和进餐前，或在两餐之间的上午10点左右和下午4点左右为宜）。②同种口腔细菌的毒性克隆株已引起广泛的注意，如牙龈卟啉单胞菌可在健康牙周的龈下菌斑中检出，也可在牙周炎的龈下菌斑中检出，深入的研究发现在牙周炎的龈下菌斑标本中检出了牙龈卟啉单胞菌的毒性克隆株；反之，在健康牙周检出的是非毒性克隆株，所以微生物评价标准应考虑毒性克隆株的定性和定量测定。

2. 生态失调的标准

（1）宿主标准：前苏联医学科学院 Bilibin 教授提出的微生态失调的临床标准包括潜伏型，有一定菌群改变，但临床无明显表现，亦称亚临床型、局限型（即正常微生物在原位发生比例失调的表现，亦称定位型）和弥漫型易位病灶和血行感染。生态失调的临床评价应该包括感染型和非感染型、潜伏型、局限型、弥漫型或急性期、慢性期、静止期等。口腔生态失调的临床评价可否按以上设想制订标准待探讨。

感染是微生物对宿主组织细胞的异常侵袭和宿主反应的结果。由口腔常居微生物所导致的感染是口腔生态失调的重要临床表现，主要有龋病（牙齿硬组织的生态失调）、牙周炎（牙周组织生态失调的表现）、牙髓及根尖周病（牙髓及根尖周组织的生态失调）、口腔黏膜病（细菌、真菌或病毒所致的口腔黏膜的生态失调）、颌面外科的牙源性感染（如冠周炎、拔牙后感染）。

龋病是发生于牙齿硬组织的细菌感染性疾病。变异链球菌、表兄链球菌、黏性放线菌等致龋细菌产生酸破坏牙釉质表面（脱矿），形成龋损。引起牙齿硬组织酸蚀脱矿的直接原因

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

是细菌的作用,但影响这一生态失调的因素很多,主要包括了牙菌斑生物膜(Eh、牙菌斑年龄、细菌组成)、宿主(龋敏感性防御功能、摄取糖的种类和浓度以及习惯、遗传性、是否接受X线治疗等)。

牙髓及根尖周感染则是典型的由细菌易位引起的口腔生态失调,易位的细菌或其致病产物通过暴露的牙髓(深龋或外伤性牙折),或邻近的牙周袋侧支根管或根尖孔逆行或血行感染进入髓腔引起牙髓及根尖周组织的生态失调。引起牙髓及根尖周感染的主要细菌除变异链球菌、放线菌外,还包括多种厌氧细菌如中间普雷沃菌、产黑色素普雷沃菌、具核梭杆菌和消化链球菌属、真杆菌属(*Eubacterium*)等。

牙周病是一组有关牙的支持组织(如牙龈、牙周韧带、牙骨质和牙槽骨)的病理状态,也是牙周生态失调的表现,其结果常导致牙齿松动和丧失。现代牙周病学指出牙周效应菌(effecter species,亦称有益菌)与牙周可疑病原菌(suspected pathogens)的相互关系是影响牙周病发生和发展的重要因素,在病变部位可见有益菌的减少和可疑病原菌的增多。扶持有益菌、控制或清除可疑病原菌成为牙周病生态调控研究和治疗的指导思想。体外抗菌试验和悉生动物实验证实牙周有益菌——血链球菌,对牙周可疑病原菌——牙龈卟啉单胞菌、伴放线菌聚集杆菌的抗菌作用。

口腔黏膜病是发生在口腔黏膜的病理表现,它可以是由微生物(细菌、真菌、病毒)直接受袭口腔黏膜,导致感染性口腔黏膜炎症,又称感染性口炎,也可以是其他全身性疾患(如艾滋病)在口腔黏膜产生的病理反应。对70例慢性口腔黏膜患者的微生物学检查发现,65.7%出现口腔菌群的失调,其中以乳杆菌和非溶血性链球菌明显下降或消失。综合治疗中纠正口腔菌群的失调,可改善或纠正口腔黏膜的生态失调。

非感染型是在口腔生态失调的临床分类中,还存在一些非口腔微生物失调导致的生态失调类型,如外伤性牙折、口腔癌症患者手术或放疗、化疗后所引起的口腔生态失调,最初的表现是口腔结构和功能的破坏,以后的表现则可能因口腔结构和功能的破坏而随之引发的正常微生物与宿主生理组合的紊乱或破坏,如外伤性牙折可能引起的继发性牙髓炎,和口腔癌症患者手术或放疗、化疗后引起的铜绿假单胞菌感染和变异链球菌异常增加引发的继发龋。

(2)微生物评价标准:口腔微生物失调是指在口腔生态区,特定生境或生态位点中定居的微生物数量、组成的异常变化及易位、毒性克隆株的增加等。健康口腔的唾液、牙菌斑(不同生态位点)、龈沟、唇、舌、颊、腭黏膜的细菌数量及组成分布可作为特定生境中口腔微生物平衡和失调的参照标准。大量的研究表明,在患龋口腔中,牙菌斑和唾液中变异链球菌的检出率和检出数量明显高于健康的无龋口腔。对此,有研究者提出唾液变异链球菌的检出率可作为龋活动性的参考指标。在特定生境中毒性克隆株和非毒性克隆株比例的变化也可作为口腔微生物失调的参照标准。研究者们发现,在健康和牙周病的龈下菌斑中均可检出牙周重要的可疑病原菌——牙龈卟啉单胞菌,但在牙周病龈下标本中检出的牙龈卟啉单胞菌毒性克隆株的比例明显高于健康牙周。

易位是微生物由原定居生境向其他生境的转移,易位多发生在原生境周围,也可发生于较远的生境或其他非口腔生态区。远距离的易位主要依赖于血行途径。牙髓及根尖周感染

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

的产生是一典型的口腔细菌易位所致。牙面的变异链球菌酸蚀牙面，进入牙本质形成龋患，继而多种牙菌斑生物膜和唾液中的细菌，如放线菌、产黑色素厌氧杆菌等细菌易位，导致牙髓感染；牙周细菌易位（逆行性感染）也可导致牙髓及根尖周感染。细菌易位还可见于各型牙周炎、颌面牙源性感染（冠周炎、拔牙后的干槽症等）以及龈沟细菌牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌、口腔螺旋体等易位形成深牙周袋；唾液细菌及牙菌斑生物膜细菌易位是冠周炎及拔牙后感染的重要原因。

（四）影响因素

影响口腔生态系平衡的因素主要来自宿主、微生物和外环境，这三大因素可能是单独起作用，也可能协同作用，既相互联系又相互影响。

1. 宿主因素　影响口腔生态平衡的宿主因素主要包括生理因素和病理因素两个方面。

（1）生理因素：即宿主正常生理功能的变化，包括宿主的增龄性变化引起的口腔组织器官及口腔生理功能的变化。从婴儿的无牙口腔到幼儿的牙萌出、牙列完整至中老年期的牙丧失、唾液分泌的减少等都可能影响或破坏口腔原有的生态平衡，但生理功能的影响往往可通过自我调控得以恢复，所以是暂时性或阶段性的，并以重新建立新的生态平衡为其特征。此外，个人的嗜好（如吸烟、嗜好蔗糖食品）、口腔卫生习惯、免疫、遗传、激素分泌等也可能影响口腔生态系的平衡。

（2）病理因素：包括宿主口腔疾病的发生，如牙体牙髓病、牙周病、黏膜病、颌面部的牙源性和非牙源性感染、唇腭裂、口腔肿瘤、某些系统性疾病［如白血病、糖尿病、遗传性疾病（掌趾综合征）］以及医源性病（如拔牙后感染、口腔肿瘤的放化疗）等。因病理改变引起的口腔生态系生态平衡的破坏是自我调控不能改变的生态失调，所以是不可逆的，除非通过治疗措施方能得到缓解或重新建立新的生态平衡，如龋洞的充填、牙周炎的洁刮术及药物治疗等。

头颈部恶性肿瘤放疗后因唾液分泌减少常常导致变异链球菌的异常增多。引起微生态失调的最典型因素是抗生素的不合理使用。口腔感染性疾病的抗菌治疗可引起口腔敏感菌迅速减少，并出现耐药菌株或异源菌定植或增多，包括假丝酵母菌、肠杆菌等。目前，含抗菌物质的漱口水和牙粉已得到广泛使用，但应注意合理使用，避免造成口腔微生态平衡失调。假设抗生素不会抑制宿主的防御功能，那么上述观察结果则表明内源性微生态体系本身就是重要的宿主防御因素之一。

2. 微生物因素　生态学家认为，在生态系中，物种越多越易保持生态平衡，当环境变化时，生态系的自我调控机制包括牙菌斑中各类微生物之间的相互作用，既有有益的共生作用，也涉及相反的竞争和拮抗作用。菌斑内某些细菌的代谢可产生影响其他微生物生长的因素，包括特殊必需的营养物质的利用及毒性和抑制物质的大量堆积。这些代谢产物也可能引起牙菌斑出现水平向和垂直向的分层变化，这种微生物的多相性有利于细菌间的共生即同一位点的细菌彼此不竞争。离体实验证实了这种相互作用，并推测在体内的情况与此相似，但这种相互作用在维持牙菌斑生态平衡的有意义的实验数据极少。在相互作用研究方面，实验模型系统（如人工口腔、连续培养和限菌动物）尤为重要。

细菌生长必需的大多数营养物质是有限的，因而常驻菌（特别是共位群细菌）之间的生

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

长主要依靠内源性的营养物质。动物实验表明宿主利用的食物和食物组成对牙面上链球菌和放线菌的生长速度不会产生明显的影响。牙菌斑微生态系统可产生一系列的蛋白酶和胞外糖苷酶，表明碳、氧主要来源于唾液蛋白和糖蛋白，特别是黏蛋白的降解。个别菌拥有不同但相互重叠的酶活性，当它们共同存在时，可增强对糖蛋白的降解。这种酶活性互补现象已在龈下菌斑人血清培养中发现。细菌经过这种方式可将对营养物质的直接竞争转变为协同分解。类似的方式还出现在以下两种情况中：①形成菌斑基质的胞外多糖的代谢；②口腔链球菌对唾液蛋白的共同利用。连续混合培养和限菌动物实验研究指出，对个别氨基酸、肽、碳水化合物的争夺明显影响着细菌的最终组成。牙菌斑中不同种类的细菌长期共存直接证明了单一营养物质无法限制所有细菌的生长，一些细菌会尽可能采取变通的代谢途径以避免直接竞争从而获得生存。

第五节　动力学影响因子

一、唾液和龈沟液

唾液是一种组成复杂、具有多种功能的重要的体液。唾液主要来源于 3 种不同的腺体：腮腺、下颌下腺和舌下腺。每种腺体的分泌物的组成存在着不同。腮腺是淀粉酶的主要来源；舌下腺和下颌下腺分泌大量的黏蛋白。在口腔中，唾液参与了咀嚼、发音、吞咽、味觉的灵敏性、黏膜润滑、抗菌、抗真菌和抗病毒，在牙齿萌出后，唾液还参与了调节牙体硬组织的离子平衡、获得性膜的形成和限制酸扩散等生理活动。唾液以部分溶解的碳水化合物和多肽的形式将食物来源的营养转运到生物膜。唾液成分中的蛋白和糖蛋白也能成为细菌生长的底物。

龈沟液（gingival crevicular fluid，GCF）的组成比较复杂，其成分更接近于血清，龈沟液中蛋白浓度比唾液高 30 倍，是口腔中免疫球蛋白 G 的主要来源。龈沟液主要在龈沟内流动，每天分泌量只有 0.5～2.4ml，唾液每分钟分泌量达到 0.5～2.0ml。龈沟液和唾液的差异决定了龈下硬组织表面微环境（接触龈沟液）和龈上硬组织表面微环境（接触唾液）存在着显著的差异。龈上硬组织表面、龈下硬组织表面和软组织表面的获得性膜，其分子组成的不同能介导称为组织嗜性的特殊的细菌黏附。

二、牙脱矿和再矿化

龋病是发生在牙体硬组织上的慢性、细菌性、进行性疾病。龋病发生的直接原因是牙菌斑生物膜微环境的变化，即糖代谢后酸清除率低下，乳酸大量滞留导致菌斑液对牙矿物质高度不饱和状态，致使牙脱矿和再矿化平衡破坏，进而导致龋病的发生。口腔微生态失衡造成硬组织中晶体的溶解、钙磷以及其他离子成分的流失，进而造成牙硬组织脱矿。而当钙磷离子沉积于脱矿的牙硬组织的晶体空隙，促进矿物含量的增加，即为再矿化过程。在正常口腔微环境中，脱矿和再矿化是一个动态的平衡过程。Featherstone 等提出了“龋病平衡”的概念，该平衡概念中包括了保护性因素和病理性因素。保护因素（如唾液、氟、抗生素等）能促

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

使平衡偏向再矿化方向，病理性因素（产酸细菌、高频率碳水化合物的摄入、异常唾液流量和功能等）则使平衡向脱矿方向偏移。氟是研究最为广泛的调节矿化平衡的物质。目前认为氟的作用机制为能促进牙体硬组织再矿化，抑制脱矿和抑制细菌。

三、微生物的相互作用

牙菌斑生物膜是一个多菌种组成的复杂的生态系统。在牙菌斑的生长发育过程中，微生物通过合作或者竞争关系而相互作用。细菌之间的相互作用通过不同的机制影响到牙菌斑生物膜生态系。

（一）相互聚集

目前认为牙菌斑生物膜的形成经历不同的阶段，首先是获得性膜形成；早期细菌黏附于获得性膜；细菌通过相互聚集黏附于早期定植的细菌；细菌增殖生长和生物膜的形成。在早期细菌黏附过程中，多种口腔链球菌能够黏附到特定的蛋白，如α-淀粉酶、富含脯氨酸的蛋白、富含脯氨酸的糖蛋白，因此链球菌能在早期生物膜的形成中占据优势。格氏链球菌是牙菌斑生物膜早期定植的菌种之一。该细菌能黏附到酸性的富含脯氨酸的蛋白，该蛋白占据了口腔唾液蛋白的25%～30%。格氏链球菌的α-淀粉酶连接蛋白能与唾液淀粉酶结合，这种结合被认为是格式链球菌黏附于牙齿表面的机制。血链球菌是另一种能早期选择性定植于牙齿表面唾液蛋白膜的细菌。该细菌在牙齿萌出后就能在口腔中检测出并成为口腔常驻细菌之一。一种富含分泌型免疫球蛋白A和α-淀粉酶的复合体成为血链球菌的黏附位点。

不能直接黏附于牙齿表面的游离细菌可以通过受体与早期定植于牙齿表面的细菌连接。相互聚集是一种发生在不同细胞之间的特殊的细胞间的反应，也是口腔细菌定植和牙菌斑生物膜形成的最重要的机制之一。在生物膜生长发育过程中，早期细菌黏附导致了新生交界面的出现，该交界面形成了连接相互聚集细菌成员之间的桥梁。牙龈卟啉单胞菌的长菌毛由FimA蛋白组成，能黏附于口腔链球菌表面存在的甘油醛-3-磷酸脱氢酶。因此，牙龈卟啉单胞菌能与早期定植的链球菌相互聚集。

具核梭杆菌能与多种口腔细菌共聚集，包括链球菌和专性厌氧菌。因此，具核梭杆菌是牙菌斑生物膜的关键组成，起到协调早期和后期定植细菌的作用。具核梭杆菌和其他口腔细菌的相互聚集主要依靠细菌表面分子之间的作用。具核梭杆菌与革兰阴性细菌之间的相互聚集主要是依靠由凝集素-碳水化合物（lectin-carbohydrate）的相互作用介导。牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌之间是由牙龈卟啉单胞菌表面的半乳糖苷部分和具核梭杆菌表面的凝集素部分之间的介导，并受到乳糖的抑制。牙龈卟啉单胞菌血清型K5的荚膜多糖和脂多糖起到了介导细菌之间相互聚集的受体作用。具核梭杆菌和许多其他革兰阳性菌同样能相互聚集，但是几乎不受糖抑制。表明具核梭杆菌与革兰阴性细菌和革兰阳性细菌之间的相互聚集存在着较大差异。口腔细菌之间的相互聚集不仅有助于细菌通过理化机制的黏附，同时也有助于细菌之间代谢交流和基因交换。

（二）食物链

口腔细菌所需营养成分主要是由唾液、龈沟液、含碳水化合物的食物、食物碎屑以及其他细菌的代谢产物等提供。口腔细菌之间的代谢通信可能通过一种微生物的代谢产物成为

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

另一种微生物的营养成分，或者通过一种微生物的细胞外酶作用降解底物产生其他微生物所需的底物而实现，例如口腔链球菌水解宿主糖蛋白所产生的单糖对于口腔链球菌和其他口腔细菌的生存和持续生长具有重要意义。同样的，被革兰阳性杆菌去唾液酸化的免疫球蛋白 A1 能有助于其他口腔细菌的蛋白水解活动。

生物膜中细菌代谢产物可以作为其他成员的能量来源，由口腔细菌提供的短链的脂肪酸被认为是一些口腔细菌必要的碳来源。链球菌产生乳酸可以与韦荣菌形成共生关系。链球菌和韦荣菌经常出现在口腔中的相同位置，临床研究表明这些菌种与牙周健康相关。链球菌产生的短链酸（如乳酸）能被韦荣菌使用，因此两者数量存在着平行关系。牙龈卟啉单胞菌与齿垢密螺旋体常被同时在患有牙周炎的患者口腔生物膜中检测出。共生关系的存在，两者的生长得到加强。两者产生的生长因子为短链的脂肪酸。齿垢密螺旋体产生的生长因子为琥珀酸，能纳入牙龈卟啉单胞菌细胞外被膜上的脂质和磷脂。

牙龈卟啉单胞菌产生的异丁酸能刺激齿垢密螺旋体的生长。因为两种菌种能相互聚集，它们的代谢产物能在不被稀释的情况下相互接触。几种外源醌能影响到细菌的生长和代谢。外源醌被认为是在细菌代谢中起到电子受体的作用。外源醌有助于将无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*）代谢从无氧代谢转化为呼吸，这种代谢转化与小鼠败血症模型中的毒力相关，推测无乳链球菌可能受益于通过捕获其他细菌来源的甲基萘醌的生态位。

维生素 K 对大多数普雷沃菌属（*Prevotella*）和卟啉单胞菌属（*Porphyromonas*）细菌的生长具有刺激作用。人体不能合成维生素 K，因此营养缺陷型微生物从生物膜中的细菌中获取维生素 K。韦荣菌能产生甲基萘醌（维生素 K_2），进而被普雷沃菌属和卟啉单胞菌属（*Porphyromonas*）细菌所利用。醌与相关复合物能促进双歧杆菌（*Bifidobacterium*）的生长。维生素 K 能促进几乎所有能从人唾液中分离的双歧杆菌的生长，而韦荣菌的培养上清液能取代这种生长因子。韦荣菌的培养物上清液中未检测出甲基萘醌，以此推断可能存在于韦荣菌的细胞内，韦荣菌培养物上清液中的生长因子推测为维生素 K 的一种类似物。甲基萘醌前体——1,4-二羟基-2-萘甲酸，同样能有效促进牙龈卟啉单胞菌和双歧杆菌的生长，这种前体在丙酸杆菌和乳酸球菌培养物上清液中被发现。甲基萘醌是细菌细胞膜的组成成分，因此，只有产生甲基萘醌的细菌死亡并释放维生素 K，维生素 K 营养缺乏型细菌才能获取所需甲基萘醌。所以，丙酸杆菌和韦荣菌产生的细胞外的类似维生素 K 的生长因子直接影响着维生素 K 营养缺乏型细菌的生长。

（三）通信

在生物膜中，微生物之间除了生化和代谢通信外，还能通过一些小分子的扩散进行通信。许多细菌已经衍变出细胞间的信号转导系统，帮助它们适应各种环境压力，并且调节基因表达。目前认为生物膜中存在着密度依赖性或者接触依赖性信号转导以及生物膜特异性基因调控。

群体感应（quorum-sensing）是细菌通过感应特定的自诱导剂来判断菌群密度和周围环境变化，当菌群数达到一定的阈值后，启动相应一系列基因的调节表达，以调节菌体的群体行为。群体感应效应能影响到生物膜的各种功能，包括毒力因子、酸耐受度和生物膜的形成，因此群体感应效应被认为是一种重要的细菌功能。自诱导分子-2（autoinducer-2，AI-2）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

是与群体感应效应相关的一种信号分子。*luxS* 基因编码的 LuxS 酶催化 AI-2 合成。*luxS* 基因是广泛分布在革兰阳性和革兰阴性细菌基因组中高度保守的基因。

感受态刺激肽（CSP）也被证明能介导细菌之间的信号转导。CSP 是一种 14～23 个氨基酸残基组成的可溶性多肽，多种口腔链球菌可以产生 CSP。CSP 涉及细菌素的产生、毒力因子和生物膜的形成。此外，CSP 还能增强遗传能力，允许外源性 DNA 进入细胞。变异链球菌来源的 CSP 能诱导细菌素（变链素Ⅳ）基因。

群体感应效应目前也成为今后口腔感染性疾病治疗的一个研究方向，AI-2 和 CSP 系统可能成为削弱细菌毒力因子的一个靶点。例如特异性靶向抗菌肽（specifically targeted antimicrobial peptides，STAMPs），STAMPs 具有两端结构：一端是一个短的 CPS 起始序列，能作为针对特定细菌的指纹并能保证 STAMPs 能定位它们的目标；另一端是连接在起始序列的非特异性抗菌肽，能杀灭目标细菌。基于变异链球菌 CSP 设计的 STAMPs 能从多菌种生物膜中特异性消除变异链球菌而不影响其他的口腔链球菌（如戈氏链球菌、血链球菌等）。

接触依赖式信号转导存在于口腔链球菌和牙龈卟啉单胞菌之间。嵴链球菌（*S. cristatus*）表面的精氨酸脱亚氨酶启动了牙龈卟啉单胞菌的一个信号转导级联，导致了编码长菌毛亚基的基因 *fimA* 下调。相反，与戈氏链球菌接触能提供给牙龈卟啉单胞菌生物膜相容性信号，因此能形成牙龈卟啉单胞菌-格氏链球菌生物膜。戈氏链球菌能上调牙龈卟啉单胞菌 *ltp1* 基因，该基因编码一种低分子量的酪氨酸磷酸酶。Ltp1 通过转录下调参与胞外多糖合成和运输的多种基因，从而限制生物膜的生长。不仅能限制单菌种生物膜的生长，同时也能限制牙龈卟啉单胞菌-戈氏链球菌双菌种生物膜的生长，能减少牙龈卟啉单胞菌接触氧气，有利于生物膜中营养物质的流入和代谢废物的流出。此外，Ltp1 能调节 *luxS* 转录活性，因此能影响到生物膜中 AI-2 依赖性信号转导通路。

（四）竞争与拮抗

由于营养和生长空间的限制，生物膜中的微生物之间也同时存在着竞争和拮抗关系。细菌素是细菌产生的限制邻近细菌生长的蛋白质杀菌物质。细菌素具有热稳定性，能在 110℃ 和高压下以及 pH6.8～8.5 范围内保持活性。

变异链球菌能产生几种称为变链素（mutacins）的细菌素，包括羊毛硫细菌素（lantibiotics）和非羊毛硫细菌素（nonlantibiotics）。变链素Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ属于羊毛硫细菌素，针对其他链球菌和革兰阳性细菌，具有相对较宽的抗菌谱。变链素Ⅳ和Ⅴ为未修饰的非羊毛硫细菌素。变链素Ⅳ特别针对口腔缓症链球菌的细胞膜。变链素的产生受基因和环境因素的影响。变链素Ⅳ是由群体感应效应通过 comCDE 控制的。而变链素Ⅰ的调控更加复杂，目前还不完全清楚。Nguyen 等研究认为变链素Ⅰ可能与 17 种参与各种不同细胞功能的基因有关，如糖转运、蛋白或多肽水解、氨基酸和核苷酸的合成、细胞壁代谢和表面粘接。一般认为细菌素的抗菌谱较窄，但是有些细菌产生的细菌素的抗菌谱相对较宽，如前面提到的羊毛硫细菌素。副干酪乳杆菌（*L. paracasei*）HL32 产生的 56kDa 的细菌素能抑制牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌、唾液链球菌和血链球菌的生长。

产生细菌素，特别是变链素，同时受到基因因素和环境因素（如细胞密度和 pH）的调节，以保证细菌素在合适的时间和位置产生。细菌素的产生能使细菌选择相邻的细菌种类，促

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

进建立具有特定细菌种类的生物膜，并在保持口腔微生态稳定性中起到重要的作用。

除了细菌素外，一些其他口腔细菌代谢产物如过氧化氢、短链脂肪酸，也是口腔生物膜中的竞争因素。例如，链球菌产生的过氧化氢能抑制其他口腔微生物的生长。血链球菌产生的过氧化氢能抑制生物膜中的变异链球菌的生长。口腔细菌能产生大量的短链脂肪酸，如碳水化合物发酵的终端产物——乳酸的产生能降低生物膜中的 pH 值，因此对于非耐酸性细菌的生长有抑制作用。

四、宿主行为及个体差异

在健康个体中，宿主与微生物存在着生物平衡。口腔微生物在天然宿主防御机制中起着重要的作用，同时也与牙周病和龋病等口腔疾病有关。牙菌斑生物膜的生态稳定性常受到一些宿主因素的影响，例如摄入高糖含量的食物、吸烟、口腔保健卫生的不足、宿主退化进程、遗传因素和免疫改变也可以影响到口腔环境，进而导致牙菌斑生态平衡被打破，转变为疾病相关的状态。此外，口腔疾病同样受宿主个体社会经济状况的影响。目前认为影响口腔生态平衡的宿主因素主要可归纳为生理和病理两方面。

（一）宿主生理功能的变化

对口腔生态平衡影响的宿主生理功能变化，包括宿主的增龄引起的口腔组织器官及口腔生理功能的变化；从婴儿无牙口腔到牙的萌出、牙列的完整，及至中老年期牙的丧失、唾液分泌的减少等都可能使口腔原有的生态平衡被破坏。此外，还包括影响宿主生理功能的其他因素如个人的嗜好（如吸烟、嗜好蔗糖食品等）、口腔卫生习惯、免疫、遗传、激素分泌等。宿主生理功能对口腔生态平衡的影响通常是暂时性的，并以建立新的口腔生态平衡为其特征。

（二）宿主病理改变

对口腔生态平衡影响的宿主病理改变，包括口腔感染疾患的发生，如牙体牙髓病、牙周病、口腔黏膜病、外伤、颌面外科牙源性感染及其他一些全身性疾患，如白血病、糖尿病、遗传性疾病（如掌趾综合征）和医源性治疗的并发症，如拔牙后感染、头颈部放疗及癌症化疗患者唾液腺破坏或功能下降所致的干燥综合征等，这些病理改变对口腔生态平衡的影响是很明显的，所致的生态平衡失调常常是不可逆的。当然，一些治疗措施也可能使口腔重建新的生态平衡，如龋洞的充填、牙周炎的洁刮治及药物治疗措施等。

尽管具有高度的遗传相似性，但是人体对不同的刺激、生物应激和环境的反应存在着差异。大多数个体中特定部位定植的群体中的微生物来自特定的科和属，但是在种和株层次上，微生物存在着差异。利用唾液在体外形成牙菌斑生物膜的研究发现，不同个体来源的生物膜中微生物组成存在着差异，与宿主牙周状况或者龋病相关的病原因素有关。此外，牙菌斑微生物反应、生物产量和对蔗糖 pH 反应均存在着个体差异。通过对龋病相关的病原因素的检测发现，口腔微生物对蔗糖反应的程度存在着宿主特异性，进而可能造成不同宿主龋病发展和治疗结果的差异。

（肖晓蓉　胡涛　程磊　邹玲　程然）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

参 考 文 献

1. 李利. 龋病相关细菌的细菌素. 国际口腔医学杂志,2009,36:32-37
2. 吴亚菲,郭永华,刘天佳,等. 不同 *fimA* 基因型牙龈卟啉单胞菌与慢性牙周炎相关性的研究. 四川大学学报(医学版),2006,37:101-104
3. 肖晓蓉. 口腔微生物学及实用技术. 成都:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993
4. 周学东,肖晓蓉. 口腔微生物学. 成都:四川大学出版社,2002
5. 周彦玢,束蓉. 口腔微生物群落结构分析方法的研究进展. 微生物学免疫学进展,2009,37:60-63
6. 褚敏,梁景平. 现代分子技术在口腔微生物生态学研究中的应用. 国际口腔医学杂志,2007,34:81-83
7. Chalmers NI,Palmer RJ Jr,Cisar JO,et al. Characterization of a *Streptococcus sp.* -*Veillonella sp.* community micromanipulated from dental plaque. J Bacteriol,2008,190:8145-8154
8. Cochrane NJ,Cai F,Huq NL,et al. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. J Dent Res,2010,89:1187-1197
9. Furuichi K,Katakura Y,Ninomiya K,et al. Enhancement of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 fed-batch culture. Appl Environ Microbiol,2007,73:3137-3143
10. Girvan MS,Campbell CD,Killham K,et al. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. Environ Microbiol,2005,7:301-313
11. Ives AR,Carpenter SR. Stability and diversity of ecosystems. Science,2007,317:58-62
12. Kang MS,Na HS,Oh JS. Coaggregation ability of *Weissella cibaria* isolates with *Fusobacterium nucleatum* and their adhesiveness to epithelial cells. FEMS Microbiol Lett,2005,253:323-329
13. Kolenbrander PE,Andersen RN,Blehert DS,et al. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev,2002,66:486-505
14. Kouya T,Misawa K,Horiuchi M,et al. Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains. J Biosci Bioeng,2007,103:464-471
15. Lhomme JP,Winkel T. Diversity-stability relationships in community ecology: re-examination of the portfolio effect. Theor Popul Biol,2002,62:271-279
16. Maeda K,Tribble GD,Tucker CM,et al. A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes. Mol Microbiol,2008,69:1153-1164
17. Marsh PD. Are dental disease examples of ecological catastrophes. Microbiology,2003,149:279
18. Neuhauser C,Andow DA,Heimpel GE,et al. Community Genetics: Expanding the Synthesis of Ecology and Genetics. Ecology,2003,84:545-558
19. Newman DK,Kolter R. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. Nature,2000,405:94-97
20. Nguyen T,Zhang Z,Huang IH,et al. Genes involved in the repression of mutacin Ⅰ production in *Streptococcus mutans*. Microbiology,2009,155:551-556
21. Palmer RJ Jr,Gordon SM,Cisar JO,et al. Coaggregation-mediated interactions of Streptococci and Actinomyces detected in initial human dental plaque. J Bacteriol,2003,185:3400-3409
22. Peterson SN,Snesrud E,Schork NJ,et al. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. Int Dent J,2011,61:11-22
23. Rosen G,Sela MN. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* PK 1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide. FEMS Microbiol Lett,2006,256:304-310
24. ten Cate JM. The need for antibacterial approaches to improve caries control. Adv Dent Res,2009,21:8-12

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

25. van der Ploeg JR, Giertsen E, Ludin B, et al. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis fimA* geno types in dental plaque. FEMS Microbiol Lett, 2004, 232: 31-37

26. Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. Gurr Opin Microbiol, 2003, 6: 191-197

27. Yamamoto Y, Poyart C, Trieu-Cuot P, et al. Respiration metabolism of Group B Streptococcus is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. Mol Microbiol, 2005, 56: 525-534

28. Yamazaki S, Kaneko T, Taketomo N, et al. 2-Amino-3-carboxy-1, 4-naphthoquinone affects the end-product profile of bifidobacteria through the mediated oxidation of NAD(P)H. Appl Microbiol Biotech, 2002, 59: 72-78

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



第七章
口腔微生物组群的生态关系

荷兰科学家 Van Leeuwenhoek 早在 17 世纪 70 年代通过自制显微镜对未清洁牙齿表面进行研究，发现在前牙牙面的少量软垢样物质中存在一些微小生物，并根据显微镜下观察结果，绘制出了这些微小生物的草图，标志着口腔微生物群落研究的开端。W. D. Miller 在 Robert Koch 教授实验室研究期间一直致力于寻找致龋细菌。1890 年，他在《人类口腔中的微生物》一书中首次提出龋病发生的“化学细菌学说”（chemico-parasitic theory），认为牙菌斑生物膜是由微生物组成。在频繁摄入可发酵糖类的易感宿主口腔，牙菌斑微生物将可发酵糖类转化为有机酸，后者导致牙齿脱矿形成龋病。以 Miller 化学细菌学为基础，进一步临床研究证明牙菌斑生物膜是口腔感染性疾病发生的始动因子。从 1924 年 Clarke 对变异链球菌的初次分离到近年来基于细菌 16S rRNA 测序的微生物组成多样性研究，已先后在口腔中发现超过 700 种细菌。

在复杂的口腔微生物群落中，并不是由单一细菌的行为决定整个复杂群落行为，而是通过微生物菌群间的相互作用来决定。以群落和微生物生态为基础的病原微生物理论为理解牙菌斑与宿主健康或疾病的关系提供了新的视角，也为口腔感染性疾病的预防及治疗提供了新的手段。口腔具有复杂的多种属微生物群落，在形成生物膜结构、执行生理功能和致病过程中，群落成员间具有广泛的相互作用。这些相互作用包括营养竞争、协同生长、拮抗作用、生长依赖性信号因子的干扰等。在这种微群落环境下，生物膜内细菌之间的相互作用可以看作是一种“战争与和平”（war and peace）的形式。

第一节　影响口腔微生物组群生态关系的主要因素

口腔微生物间的复杂生态学关系是口腔微生态学的主要研究内容及重要特性。口腔微生物组群生态关系不仅影响其自身定植和生长，且将影响微生物所处环境的生态平衡和生态失调。微生物间的关系可以是正相关关系或负相关关系，也可以是两种关系皆存。正相关关系亦称共生关系，包括中生、栖生（即单利共生）、互生和助生（即互惠共生）。负相关关系亦称拮抗共生关系，是微生物之间存在的竞争关系，是微生物之间为获得生态空间、营养物及生长因子而产生的争夺关系，包括竞争、偏生、寄生、吞噬和拮抗。目前认为，影响口腔微生物组群生态关系的主要因素包括营养底物、代谢产物以及细菌素等。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

一、营养底物

营养供给是决定口腔微生物群落组成的重要因素。为了适应特殊的口腔微生态环境，口腔微生物进化出了可有效利用这种生态微环境中营养物质的代谢途径。口腔微生物群的营养来源于宿主食物的周期性摄入、唾液、其他微生物的代谢产物以及菌斑中的多糖。当进食大量蔗糖时，变异链球菌相对于其他细菌可具有一种竞争优势。变异链球菌比其他细菌更高效地代谢蔗糖，将蔗糖快速转化为乳酸，且自身具有很强的耐酸性。变异链球菌将蔗糖转化为黏性葡聚糖分子的能力也促进其对牙面的黏附，口腔中的其他细菌则会被葡聚糖无差别"捕获"，参与到牙菌斑的发育。

口腔微生物的另一个重要营养来源是唾液及龈沟液中的蛋白质，由宿主组织及细菌产生。唾液中既含有丰富的氨基酸、蛋白质、碳水化合物、维生素和微量元素，又有适宜的 pH、温度、湿度，为口腔微生物的生长以及牙菌斑生物膜的形成提供了最佳的环境条件。当唾液蛋白质成为微生物有限的营养来源时，能够水解蛋白质的微生物便具有竞争优势。对龈下菌斑中的细菌来说尤其如此，革兰阴性厌氧菌牙龈卟啉单胞菌可稳定定植于龈下区域并导致牙周炎的原因之一便与其高活性蛋白水解能力有关。当蛋白水解能力相对较弱的细菌与牙龈卟啉单胞菌共生于生物膜中时，亦可受益于后者的蛋白水解活动。牙菌斑生物膜中两种微生物间的协同降解唾液蛋白的现象在内氏放线菌和口腔链球菌的共培养研究中也被证实。目前认为，在唾液蛋白包被表面，单一细菌很难定植，但当与其他细菌共培养时，细菌对唾液成分的联合代谢却可促进细菌在同一表面形成广泛的生物膜。

二、代谢产物

生物膜内一种生物的代谢产物可能对其他细菌产生影响，如具有较多变异链球菌的牙菌斑生物膜内血链球菌的水平多被抑制。变异链球菌可将蔗糖代谢为乳酸，且较血链球菌具有更强的耐酸性，酸性环境有利于变异链球菌获得生长优势。血链球菌则可代谢产生过氧化氢，抑制包括变异链球菌在内的其他共生菌的生长（图 7-1）。牙菌斑生物膜中的链球菌、乳杆菌在有氧条件下可产生过氧化氢。血链球菌产生的过氧化氢可抑制放线菌的生长，在牙菌斑生物膜形成初期，血链球菌在高氧压环境下能竞争性抑制其他细菌黏附于牙面上。唾液链球菌、缓症链球菌也可合成过氧化氢，在调节牙菌斑生物膜生态平衡中具有一定作用。许多与人牙周病相关的口腔厌氧菌对氧敏感，因此在血链球菌水平相对较高的牙菌斑中，变异链球菌及牙龈卟啉单胞菌的水平均较低。

细菌的代谢产物也可促进其他种群细菌的生长。变异链球菌产生的乳酸可被韦荣球菌代谢。另外，寡发酵链球菌亦可代谢变异链球菌产生的乳酸，同时通过乳酸酶的作用将变异链球菌产生的乳酸转化为过氧化氢，进而抑制变异链球菌的生长。因此，寡发酵链球菌在牙菌斑中的检出率常与变异链球菌呈负相关关系。

口腔微生物菌群间还存在合作代谢现象，不同菌株间形成了复杂的食物链或食物网结构，即一种微生物的代谢产物可成为另一种微生物的主要营养。这种相互的营养关系可以是一些细菌产生的代谢产物作为另一些细菌的营养物或必需生长因子，也可以是细菌相互提供营养物或生长因子。前者称为栖生，即一方受益，另一方不受显著影响；后者称为互生，即两方受益。两种以上共同生长的微生物互相受益的专性关系称为助生，助生是有选择性

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

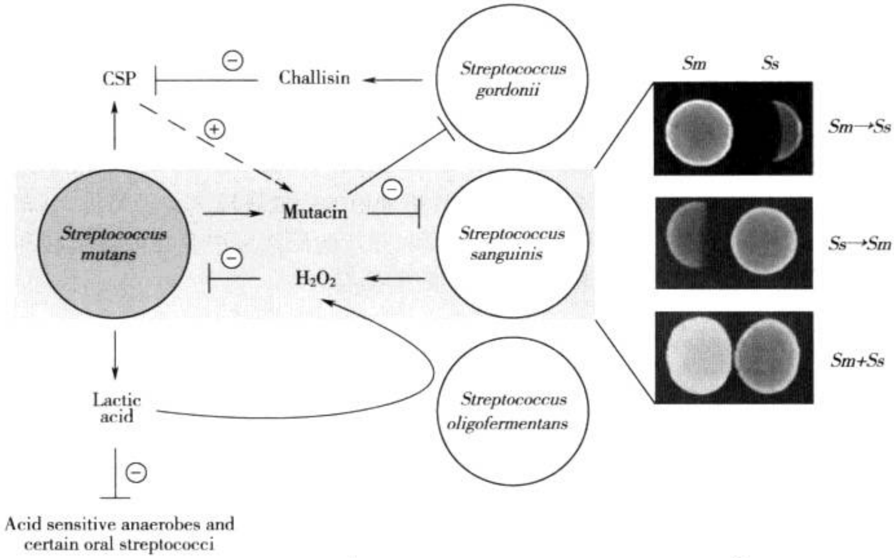


图 7-1 变异链球菌与其他口腔链球菌的菌种间相互作用

注：A. 变异链球菌与戈氏链球菌、寡发酵链球菌、血链球菌的相互作用示意图。变异链球菌产生乳酸、变链素以及 CSP，并且 CSP 促进变链素的产生。乳酸能抑制对酸敏感的厌氧菌的增殖，但乳酸可作为寡发酵链球菌生产 H_2O_2 的底物。血链球菌也能产生 H_2O_2 抑制变异链球菌的生长。血链球菌和戈氏链球菌对于变异链球菌产生的变链素敏感。戈氏链球菌利用 challisin 蛋白拮抗 CSP，降低变链素的产量；B. 接种时间对变异链球菌（*Sm*）和血链球菌（*Ss*）相互作用的影响。给予一天的提前生长优势，变异链球菌通过产生变链素抑制血链球菌（最上面的图示）；反之，给予血链球菌一天的提前生长优势，其通过产生 H_2O_2 抑制变异链球菌（中间图示）；当两种细菌同时培养时，两种细菌共存，没有明显的相互抑制（最下面图示）。图片来源：microbiology and molecular biology reviews Dec，2007；653-670

的。口腔微生物间的营养关系，不仅影响口腔细菌群落的组成，且对龋病、牙周病和牙髓病等口腔感染疾病的发生、发展有重要意义。变异链球菌在牙面定植的前提是血链球菌在牙齿定植并提供变异链球菌所需的生长因子——对氨基苯甲酸。密切相关的龈下细菌微生物能组织共有的一系列蛋白酶系统将复杂底物降解为能被群落中各个成员代谢的组分。牙龈卟啉单胞菌作为牙周病主要相关菌之一，常与其他牙周病相关细菌（如中间普雷沃菌、具核梭杆菌、福赛斯坦纳菌及齿垢密螺旋体）共存。这些微生物共培养时能协同产生较两种单菌种培养之和更多的代谢产物。牙龈卟啉单胞菌还可利用齿垢密螺旋体产生的丁二酸盐供自身生长，而齿垢密螺旋体的生长也可被牙龈卟啉单胞菌产生的代谢终产物异丁酸促进。

一些细菌可通过改变局部微环境，如微生态境的酸碱性和氧化还原电势，促进其他种属细菌的生长。具核梭杆菌和中间普雷沃菌可以在 pH 5.0～7.0 范围内生存，牙龈卟啉单胞菌不能在 pH 低于 6.5 的环境中生存。研究表明，具核梭杆菌和中间普雷沃菌可通过代谢唾液中的谷氨酸和天门冬氨酸，产生有机酸和氨中和菌斑内酸性，保护酸敏感的牙龈卟啉单胞菌免予酸攻击。变异链球菌产生大量的乳酸使菌斑 pH 降低而有益于乳杆菌生长，也是一典型的细菌通过改变局部微环境，促进其他种属细菌生长的例子。牙菌斑生物膜内微生物代谢产生的氧气、二氧化碳等可影响生物膜细菌间的相互作用。一些牙周专性厌氧菌需在高

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

厌氧环境下生长，因此可代谢氧气的细菌有利于其周围厌氧菌的生长。以具核梭杆菌与牙龈卟啉单胞菌共培养模型为例，尽管这两种细菌均为厌氧菌，但两者对氧耐受能力差别较大。牙龈卟啉单胞菌对氧非常敏感，但具核梭杆菌可耐受20%的氧含量。当在恒化培养器中共培养时，牙龈卟啉单胞菌能在含20%氧气的环境中进行生长，可能与具核梭杆菌还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide-reduced，NADH）氧化酶/过氧化物酶代谢氧和过氧化氢，为牙龈卟啉单胞菌生长提供理想的厌氧环境有关。另外，具核酸杆菌还能为牙龈卟啉单胞菌提供生长所需的二氧化碳，并代谢龈沟液中存在的谷氨酸和天冬氨酸产生氨，中和菌斑酸度，满足牙龈卟啉单胞菌的生长需求。

三、细菌素

细菌素是由细菌合成的一种杀菌能力极强的蛋白质，通过抑制蛋白质合成，影响DNA代谢，杀伤细菌细胞。与抗生素不同，细菌素的杀菌谱较窄，只对特异性细菌起作用。分子生物学和遗传学研究显示，细菌素的产生受到严格的调控，其受细胞密度、营养供给、pH等环境因素以及遗传因素的共同影响。这些调节系统使细菌素在适当的时间和部位产生，在口腔微生物群落生态平衡中发挥重要作用。口腔细菌产生细菌素或细菌素样抑菌物质，使得细菌能够选择自己的“邻居”，促进了特定种属细菌群落的建立，并在微生物群落生态平衡中发挥重要的作用。

研究发现，调节细菌的细菌素产生、运输及免疫耐受的信号网络与肽信息素感知通路密切相关，后者与细菌感受态相关信息素感知通路相似。细菌编码其细菌素前体合成、同源肽处理与转运以及双组分系统的操纵子均受细胞密度调节。肺炎链球菌毒力相关基因 *blp* 和 *com* 具有许多相似特征，如高度相似的信号肽和肽分泌系统等。此外，与细菌感受态和细菌素合成相关的信息素反应调控原件，会反过来激活下游多条信号通路。这些下游通路的交叉点多为一通用调控基因，如 *comX*，即所谓的后期感受态基因的转录调节子。A组乙型溶血性链球菌M1 SF370的基因组中含有 *comX* 和细菌素 *salA1* 位点，但缺乏编码和分泌感受态刺激肽（competence stimulating peptide，CSP）的 *com ABC* 基因，提示该细菌 *comX*（及下游通路）可被一些非CSPs类环境信号激活。A组乙型溶血性链球菌致病毒力与其他链球菌不同，推测其可通过复杂的细菌素合成调控系统，增强其在黏膜表面的定植竞争力；同时，该细菌与CSP相关编码基因的缺失，对保护其基因组不被外源DNA所污染具有重要意义。研究发现A组乙型溶血性链球菌对自身细菌素SalA1的感知与免疫耐受通路与口腔唾液链球菌对其SalA的感知与免疫耐受通路类似，均在结构上高度保守，且对相互编码的细菌素交叉敏感。因此，包括细胞密度、细菌素合成和感受态刺激等复杂的环境传感系统所组成的微妙组合，决定了口腔黏膜表面定植细菌的动态变化。目前发现A组乙型溶血性链球菌溶血素编码基因与链球菌的密度感应自诱导操纵子相似，推测其也可能利用类细菌素样溶血素作为群体感应分子。

细菌数量和密度的动态变化对细菌生物膜的致病性有重要影响。某些致病菌可通过细菌素抑制其他低毒力链球菌的生长，导致自身过度生长进而对宿主防御造成破坏。研究发现，调控细菌密度相关的基因也调控着链球菌众多毒力相关蛋白的表达。革兰阳性细菌毒力因子的表达和调控与其特定生长周期及其双组分系统密切相关，这也是革兰阳性细菌群体感应的重要特性。因此，细胞外环境中自调节信息素的浓度可视为与细菌毒力调节密切

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

相关的环境因素之一，可通过双组分调控系统启动信号转导途径来调节细菌毒力基因的表达。目前，在 A 组乙型溶血性链球菌细胞内，除 *sagA* 外，还发现了许多协同调节基因位点，如 *mga*、*csrRS*、*fasBCA* 和 *rgg* 等，参与调控其众多毒力因子表达。

口腔链球菌产生细菌素的能力最强，许多口腔链球菌都可产生肽类细菌素。黏性放线菌对变异链球菌细菌素十分敏感，后者能有效抑制黏性放线菌对牙齿表面的黏附。血链球菌产生的细菌素对非溶血性链球菌、乳杆菌、棒杆菌和放线菌的生长有明显抑制作用。各血清型变异链球菌均能合成细菌素，抑制血液链球菌、放线菌等细菌生长。因此，牙菌斑生物膜中变异链球菌的增加，常伴有血液链球菌的减少。变异链球菌血清型 C 是主要的致龋菌，其产生细菌素最多，也可能解释为何变异链球菌血清型 C 是最常见变异链球菌这一临床现象。

进一步研究发现，变异链球菌可产生至少 5 种细菌素：变链素 Ⅰ ~ Ⅴ（mutacin Ⅰ ~ Ⅴ）。变链素可抑制其他细菌的生长，影响牙菌斑生物膜的形成及发育。在变异链球菌的细胞及培养基上清液中均可以检出变链素。蔗糖可抑制变链素的合成，且大部分变链素对蛋白酶降解敏感。变链素 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ 属含羊毛硫氨酸的乳链菌肽（lanthionine-containinglantibiotics），抗菌谱相对较宽，而变链素 Ⅳ、Ⅴ 是未修饰的非乳链菌肽（nonlantibiotics）。变链素 Ⅳ 对缓症链球菌具有显著抑制作用。变异链球菌 UA159 菌株全基因组信息显示，其含有至少 9 个变链素编码基因，提示变异链球菌具有多种可用于共生存竞争的"武器储备"。研究表明，变链素的作用与变异链球菌在口腔生物膜中的生存、定植密切相关。变链素可抑制血链球菌的生长，这可能是变异链球菌水平较高的菌斑中血链球菌检出水平较低的原因之一。因此，生物膜成员细菌素的表达可能决定了其共生菌的种类。

许多口腔微生物都能产生细菌素样成分与其他种属细菌竞争。血链素（sanguicin）是血链球菌产生的一种从血链球菌细胞内及培养基上清液中分离出的分子量在 11 000 ~ 28 000Da之间的细菌素，也有研究者分离出分子量在 28 000 ~ 56 000Da 之间的血链素。血链素对牙龈卟啉单胞菌、伴放线菌嗜血菌、中间普雷沃菌、具核梭杆菌、二氧化碳嗜纤维菌具有明显的抗菌作用。

牙龈卟啉单胞菌和产黑色素的普雷沃菌可产生一种分子量为 4.1×10^4 Da 的细菌素样物质——变黑素（nigrescin），不仅可抑制口腔中不产生黑色素的革兰阴性无芽胞厌氧杆菌如口腔普雷沃菌、二氧化碳嗜纤维菌、梭杆菌等，还可抑制口腔链球菌群细菌（如唾液链球菌）的生长。另外，研究显示中间普雷沃菌、二氧化碳嗜纤维菌、伴放线菌聚集杆菌、流感嗜血杆菌、具核梭杆菌、啮蚀艾肯菌等细菌也可产生细菌素及细菌素样物质。齿垢密螺旋体基因组测序显示其至少有 3 个潜在细菌素分泌系统，提示该菌也可能具有细菌素合成和分泌功能。

细菌素还可作为信号分子相似物影响细菌种群间的相互作用。A 组乙型溶血性链球菌和唾液链球菌产生的羊毛硫细菌素在结构上同源，并可与彼此的双组分信号系统交互作用。这两种细菌通过拮抗生长依赖性信号转导抑制对方的生长，因此唾液链球菌可以阻止高毒力 A 组乙型溶血性链球菌形成生物膜。

第二节　共生与拮抗对口腔微生物群落的影响

口腔微生物间的相互关系包括正相关关系和负相关关系。正相关关系即共生关系，包

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

括中生、栖生（即单利共生）、互生和助生（即互惠共生），而负相关关系即拮抗共生关系，是微生物之间存在的竞争关系，是微生物之间为获得生态空间、营养物及生长因子而产生的争夺关系，包括竞争、偏生、寄生、吞噬和拮抗。口腔生物膜内细菌间的共生与拮抗不但会影响生物膜内各细菌的组成与分布，还可影响细菌生物膜的形成能力及致病毒性。

一、细菌间相互作用与生物膜内细菌定植

口腔生物膜内细菌间相互共生与拮抗作用的净效应会影响某些微生物在生物膜结构内的生存和定植。通过荧光显微镜观察牙龈卟啉单胞菌与戈氏链球菌双菌种体外生物膜，发现前者多定植于后者细胞外层，尤其在戈氏链球菌细胞大量聚集的区域更加明显。此外，韦荣球菌属和链球菌的体外和体内研究也发现类似空间位置关系。

研究表明，微生物细胞间聚集生长形成生物膜而非随机分散分布，与共生在生物膜内的“先驱菌”的共生作用有关。另外，一种微生物对另一种微生物在初始定植时的拮抗作用会导致两种微生物彼此分离，各自聚集生长。

生物膜内微生物的聚集生长由细菌间共聚作用介导。体外、体内生物膜研究证明，牙龈卟啉单胞菌能够与口腔链球菌聚集，定植在含有口腔链球菌的生物膜内。因此，链球菌在牙菌斑的初始定植，有利于牙龈卟啉单胞菌定植到牙菌斑，成为牙菌斑的一部分。一些微生物在体外自身不能形成生物膜，如口腔内齿垢密螺旋体在多数惰性表面不形成生物膜，但可通过细菌间的聚集作用定植在牙龈卟啉单胞菌生物膜内。因此，通常在牙龈卟啉单胞菌的外围检测到齿垢密螺旋体定植。福赛斯坦纳菌在没有具核梭杆菌的情况下，很难定植形成生物膜。口腔牙菌斑样本中经常检测出成对的微生物，表明共聚效应在口腔牙菌斑生物膜形成过程中具有重要地位。

二、密度感应系统相关信号分子与生物膜形成

细菌信号转导系统在单菌种生物膜形成过程中具有重要作用。如果受到生物膜内已有细菌代谢或传递的某些信号分子的干扰，会抑制后续细菌的定植。细菌间通过分泌信号分子调控特定基因的表达，随着细菌的生长，分泌的信号分子浓度不断增加，达到一定阈值，细菌细胞内密度感应的受体蛋白与信号分子结合后被激活，称为密度感应系统（quorum sensing system）。经激活的密度感应受体蛋白将调控信号分子的合成、毒性因子生成、与生物膜形成相关基因的表达。密度感应现象只有在细菌浓度达到一定阈值时才发生，也称为细胞密度依赖性基因表达（cell density dependent control of gene expression）。信号分子多为可溶性小分子，由细菌持续合成并释放到周围环境，但合成与释放的数量都极其微小。当细菌密度达到一定程度，信号分子浓度达到阈值时才发生作用。

密度感应系统同细菌的致病性密切相关。致病菌在密度很低时就可产生毒力因子，但由于其数量有限，不会对宿主产生显著影响，反而很快被宿主的免疫系统识别并消灭；当细菌密度达到一定数量后，可产生大量毒力因子，进而显著影响宿主，有利于细菌的生存、繁殖和致病。密度感应是细菌之间存在的重要信号交流系统，对细菌生物膜的形成和生理功能有重要影响。密度感应系统可调控细菌间的代谢活动。韦荣菌与戈氏链球菌共培养时，前者可促进后者 α-淀粉酶的表达。嵴链球菌的表面蛋白能抑制牙龈卟啉单胞菌鞭毛基因的表达，影响生物膜的形成和其他厌氧微生物的致病性。生物膜内信号分子的多样性以及在调

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

控基因表达、促进生物膜形成中的重要作用，为研究信号分子的拟似物用于干扰和控制牙菌斑生物膜的形成提供了重要思路。

口腔微生物间普遍存在一种自体诱导分子（autoinducer 2，AI-2），其合成酶基因 *luxS* 受密感应系统调控，是一种潜在的生物膜内异质性细菌间相互作用的信号分子。口腔微生物 *luxS* 的缺失可通过其他微生物来弥补，提示 AI-2 信号分子在口腔细菌中的高保守性。AI-2 是体外多菌种生物膜形成所必需的信号分子。同时失活共培养牙龈卟啉单胞菌和戈氏链球菌的 *luxS* 基因，两种细菌均不能形成生物膜，但任意失活一种细菌 *luxS* 基因，两种细菌均能形成生物膜，提示细菌间的相互作用有利于牙龈卟啉单胞菌定植到革兰阳性细菌所形成的生物膜内。此外，AI-2 信号分子还可介导口腔链球菌和内氏放线菌双菌种生物膜的形成。进一步研究发现，生物膜形成过程中存在一个最适 AI-2 浓度，当高于或低于此浓度时生物膜形成均受抑制。

Merritt 等学者发现，高密度生长状态下的变异链球菌 *luxS* 基因缺陷株不能产生变链素Ⅰ（mutacin Ⅰ）。通过微阵列分析发现，Smu1274 转录抑制子可被 *luxS* 基因缺陷诱导。Smu1274 的编码基因 *irvA* 可作为诱导抑制子抑制变链素Ⅰ编码基因表达。将 *luxS* 和 *irvA* 基因同时缺失，可恢复细菌变链素Ⅰ的合成能力，而结构性表达 *irvA* 的变异链球菌其变链素Ⅰ的合成受抑制。因此，细菌密度感应系统在细菌素的合成过程中具有重要地位，调控着细菌在口腔微生物群落内的“战争与和平”。

口腔链球菌（如变异链球菌、戈氏链球菌和血链球菌）的信号转导系统由感受态刺激肽 CSP 介导。CSP 分子具有较强的种属特异性，一种微生物的 CSP 分子不会干扰另一种微生物的 CSP 活性。戈氏链球菌能表达一种蛋白酶 challisin，通过降解 CSP，抑制变异链球菌与 CSP 相关的细胞表型（见图 7-1）。因此，可以推测牙菌斑生物膜内其他各种形式的细菌蛋白水解酶，可通过降解牙菌斑内肽类信息素，干扰包括致龋链球菌在内的其他细菌的信号转导，调控细菌生理表型。目前已有研究证实，牙龈卟啉单胞菌能够通过其蛋白酶，干扰感受态变异链球菌的转化。

研究发现，嵴链球菌富集的龈下生物膜区域可抵抗牙龈卟啉单胞菌的定植。嵴链球菌是牙菌斑生物膜中的晚期定植细菌，具有特征性菌毛丛。嵴链球菌常见于牙周袋，能黏附于具核梭杆菌表面形成在成熟菌斑生物膜中常见的“玉米棒”状结构。嵴链球菌与牙龈卟啉单胞菌的接触可触发牙龈卟啉单胞菌的信号转导级联反应，诱导后者下游 *fimA* 基因表达下调最终使细胞表面菌毛减少，进而抑制牙龈卟啉单胞菌的黏附与定植。这一信号由嵴链球菌表面的精氨酸脱亚胺酶（ArcA）介导。尽管精氨酸脱亚胺酶参与将精氨酸转化为鸟氨酸、氨和 CO_2 的精氨酸代谢通路，ArcA 信号转导通路与其酶活性并无直接关联。戈氏链球菌也表达 ArcA，但由于在 *arcA* 的顺式代谢产物应答因子以及反式作用调节蛋白的表达差异，嵴链球菌的 ArcA 处于高表达水平，进而显著抑制牙龈卟啉单胞菌 FimA 合成。

三、细菌间相互作用与生物膜致病性

生物膜内细菌间的相互作用能够影响其对抗菌药物的敏感性。体外培养变异链球菌和韦荣球菌双菌种生物膜对氯己定的抗菌能力显著强于单菌种生物膜，推测与生物膜内两种细菌的聚集作用相关。变异链球菌和戈氏链球菌在牙菌斑生物膜内的生长一般具有负相关关系。近期研究发现，戈氏链球菌可通过失活变异链球菌的感受态刺激肽 CSP，拮抗后者密

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

感应系统(见图 7-1)。进一步的研究显示,变异链球菌对各种抗菌剂的抗性随其 CSP 的失活而降低。因此,生物膜内的戈氏链球菌可通过拮抗变异链球菌的密度感应系统,增加变异链球菌对内源性抗菌剂(如组胺素)的敏感性。虽然尚无体内研究支持这种拮抗作用,但仍提示生物膜内微生物的相互作用可影响相关细菌对抗菌物质的抗性。

动物实验发现,两种或多种口腔细菌间的协同作用可增强其致病毒力。合并感染牙龈卟啉单胞菌和福赛斯坦纳菌的小鼠脓肿模型,动物发生病灶率和死亡率均高于单一菌种感染。在牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌和齿垢密螺旋体以及牙龈卟啉单胞菌和伴放线菌聚集杆菌的合并感染的小鼠脓肿模型实验研究中也发现类似结果。目前推测这一协同致病作用与细菌间合作代谢、促进更多病原微生物生长进而加重感染有关。

细菌间的相互作用影响生物个体或群体的生长,在生物膜内毒力特性方面具有特定的效果,影响整体结构的致病性。牙菌斑生物膜内的一些微生物能够中和变异链球菌的代谢酸,降低致龋性。导致乳酸代谢或者碱性物质的终止生产,后者涉及的物质有氨或者牙菌斑内一些生物体尿素酶的表达。唾液内含有大量的尿素酶,能够将一些底物转化为氨。

口腔链球菌能生产有细胞毒性的强氧化剂——过氧化氢,在与内氏放线菌形成的混合菌落中,链球菌能自我保护避免氧化损伤。过氧化氢也能作为伴放线菌聚集杆菌的信号分子,当与链球菌共培养时,伴放线菌聚集杆菌更能抵抗人类血清的杀灭作用。过氧化氢能被氧化应激应答调节子 OxyR 感应,其后引发伴放线菌聚集杆菌的补体耐药蛋白 ApiA 上调。

细菌毒力因子的表达受到密感应系统的严格调控。因此,通过调节细菌密度感应调控因子的相对浓度,对生物膜整体的致病性有重要影响。变异链球菌的细菌素合成依赖于密感应系统调控因子 CSP 水平。变异链球菌细菌素可抑制相关非致龋链球菌的生长,通常被认为是一种毒力因子。此外,CSP 还可能调节变异链球菌的其他毒力特性。因此,降低生物膜内变异链球菌 CSP 浓度,可降低生物膜的致龋性。非致龋菌戈氏链球菌能够使变异链球菌 CSP 失活,进而调节生物膜的致龋毒力。

伴放线菌聚集杆菌的白细胞毒素是公认的牙周致病毒素之一,其表达依赖 AI-2 的水平,因此降低此信号分子的水平可影响细菌致病毒力。虽然目前还未发现能够失活生物膜内 AI-2 的口腔细菌,但大多数生物膜内细菌都含有 AI-2 的结合系统,因此生物膜内细菌对局部 AI-2 的竞争可能影响生物膜的毒力。

第三节　细菌生物膜内遗传物质交换

基因水平转移(horizontal gene transfer,HGT)是指遗传物质从一个生物体转移到另一个生物体的基因组中。随着对细菌基因组序列的成功破译,越来越多的证据表明,遗传物质在细菌间水平转移的现象广泛存在。基因水平转移可以发生在同种细菌之间,也可以发生在不同种细菌之间。基因水平转移能使细菌在短时间内产生新的基因型个体,获得新的遗传性状,改变物种特征,以适应环境的变化。基因水平转移在细菌的进化和物种的形成中具有重要意义。

在自然环境中,大多数细菌附着于生物体或非生物体表面,形成由微菌落组成的膜性聚集物,即生物膜(biofilm)。生物膜中的细菌相互聚集、紧密邻接,为不同种属细菌间的基因交换提供了外在条件;生物膜中细菌的生理特性,也影响基因交换的实际发生。从生物强化

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

策略来讲,细菌在生物膜内遗传物质的交换更具优势。

人类口腔环境中具有复杂的多种属微生物群落,这些微生物可附着在牙齿表面形成典型的生物膜,又称牙菌斑(dental plaque)。大多数定植于人类的细菌主要经口腔进入。毋庸置疑,在口腔环境中,口腔定居菌与口腔过路菌之间可能会发生基因交换,口腔生物膜内的菌群之间也会发生基因的交换。口腔生物膜被认为是"基因型的储存库(genotypic reservoirs)",口腔生物膜中多种属微生物种群间的基因交换,对口腔微生物群落多样性的形成、菌种的进化、菌株的致病性及耐药性的形成等具有重要意义。

依据基因水平转移过程中所交换的遗传物质的来源及交换的方式不同,细菌间自然发生的基因水平转移有转化、接合、转导、溶原性转换等方式。

一、生物膜中通过转化进行的基因转移

转化(transformation)是指细菌通过高效摄取外源生物的 DNA 分子,并将其重组于自身基因组中,从而获得新的遗传性状的现象。转化现象的发生通常需要具备三个必要条件:一是游离 DNA 的存在,即供体菌释放 DNA 于胞外形成细胞外 DNA(extracellular DNA,eDNA);二是能够摄取外界 DNA 的生长状态细菌感受态的形成;三是外源 DNA 与受体菌的重组。

与浮游生长的游离细菌比,细菌在生物膜中进行转化基因转移的能力大大提高,如变异链球菌突变细胞的转化率高达 4×10^{-3}/每个细胞,比浮游菌的突变率高 10～600 倍。

释放 DNA 被认为是细菌生存的本能,受基因调控。DNA 的释放可由细胞的溶解所致,也可通过其他方式,如菌体以转运小泡的方式将自身 DNA 释放到环境中。在标准培养基中生长的细菌几乎都能检测到游离 DNA 的存在。研究显示,高活性的自溶酶可使胞外 DNA 增多;胞外 DNA 可作为细菌的营养,还可促进细胞与基质之间、细胞与细胞之间的连接,利于生物膜的形成。戈氏链球菌释放 DNA 受密度感应系统调控,该系统由 *comC*、*comD* 和 *comE* 三个基因组成,它们参与自溶酶的产生,该组基因的缺陷可导致生物膜形成能力的减弱。其机制在于该组基因的突变会导致菌株自溶酶的活性缺陷,引起胞外 DNA 分子缺乏,最终使生物膜的形成缺陷。游离 DNA,作为转化发生的外在因素,高浓度的 DNA 可提高遗传物质的转化率(接受了外源 DNA 的受体细胞的比例)。在高密度的生物膜菌群中,细菌释放 DNA 的能力以及摄取 DNA 的能力显著提高,因此,在生物被膜状态下转化率也大大提高。

生物膜中细菌的生理状态影响细菌 DNA 的转化,而生物膜中细菌的生理状态与生物膜的成熟程度及结构特点有关。变异链球菌生物膜中细菌的最佳的基因转化阶段是在生物膜形成的 16～24 小时,此时生物膜中菌体的生理状态与液体状态下的感受态细胞近似。在牙龈卟啉单胞菌生物膜中最佳的基因转化阶段是在生物膜形成的 24 小时(图 7-2)。

一般认为,生物膜形成过程中,生物膜菌群的生理特性在不断发生变化,这种变化是受群体感应系统调控的。生物膜形成早期,群体感应系统的信号分子尚未达到足够的浓度,因此,此时的生物膜中细菌不具有转化能力。而当生物膜形成 16～24 小时,细胞聚集,形成微菌落,信号分子浓度逐渐提高,细胞生长活跃,处于感受态,此时菌体更易获取外源 DNA,即被优先转化。而在老化的生物膜中,转化率则大大降低,其原因可能是由于生物膜外的基质增多形成了扩散屏障,使菌体不易摄取到 DNA;或由于生物膜内环境氧含量减低以及细胞新陈代谢水平减低,没有能力摄取外源 DNA。因此,生物膜感受态的形成是细菌程序化调控的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

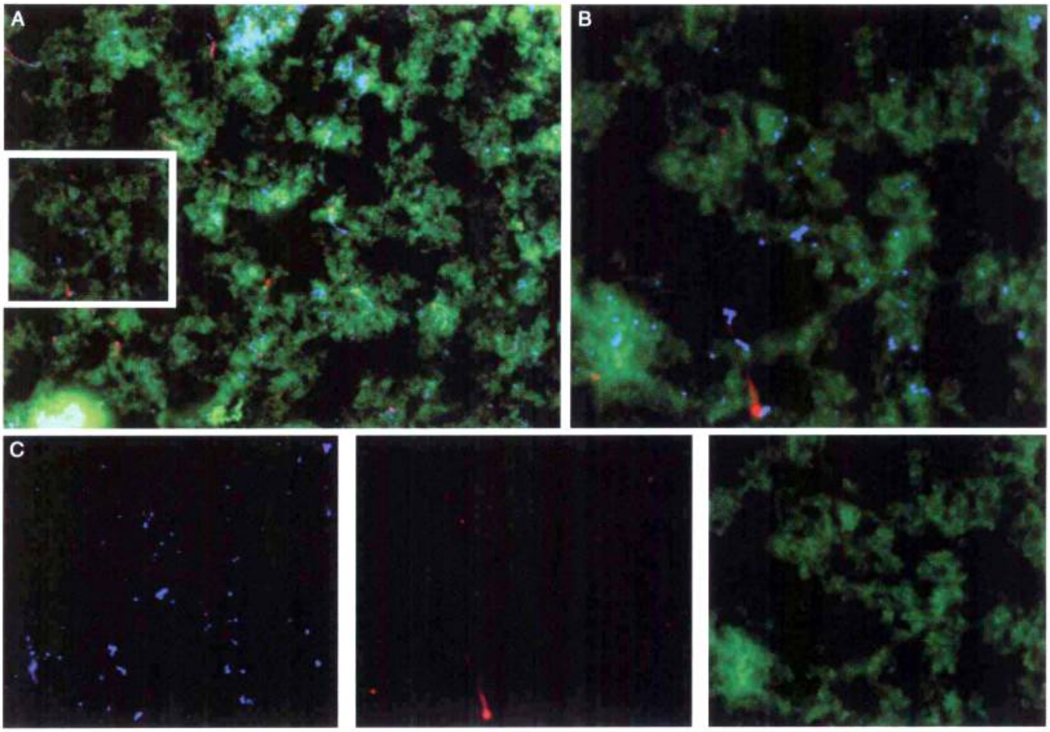


图 7-2 牙龈卟啉单胞菌 24 小时生物膜细胞外 DNA 荧光染色图

注:绿色为细胞外 DNA(GelGreen 标记),红色为死菌(propidium iodide 标记),蓝色为活菌(DAPI 标记)。A. 牙龈卟啉单胞菌 24 小时生物膜合并图片(×40 倍物镜);B. A 中白色图框内图像放大图片;C. B 中三通道颜色标记合并前独立图片。图片来源:mBio,2012,3:e00231-11

结果,生物膜的感受态处于生物膜生长的某个时间段或某个生长期,既与生物膜中细菌的生理状态有关,也受生物膜的结构特点的影响。

在生物膜中的基因转化既可发生在同种微生物之间,也可发生在不同种微生物之间。有研究小组将齿垢密螺旋体和格氏链球菌混合培养,形成了一个特殊的混合型生物膜,在这个混合型生物被膜中,一个非接合性质粒从齿垢密螺旋体转移到了格氏链球菌上。这个非接合性的质粒由齿垢密螺旋体释放到胞外,再被其周围的格氏链球菌摄取。

在生物膜形成的早期,细菌释放的胞外 DNA 分子作为黏附素,可促进细胞与基质、细胞与细胞的连接,利于生物膜的形成;胞外 DNA 分子的存在对成熟生物膜起到稳定作用,与生物膜菌群的抗性相关。在生物膜活跃生长期,细菌处于感受态时,胞外有大量 DNA 释放,为 DNA 的转移提供了外在条件,使生物膜中菌群间基因的转化率提高。生物膜的形成、DNA 的释放及基因转移都是在基因调控下进行的,在生物膜的增长模式中,细菌表现出较强的抵抗力,同时又能在短时间内获得新的遗传性状,对细菌的生存和进化是非常有利的。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、生物膜中通过接合进行的基因转移

接合(conjugation)是供体菌和受体菌通过完整细胞间的直接接触,以性菌毛(sex-pili)连接传递大片段DNA,使受体菌获得新的遗传性状的现象。大片段DNA通常为质粒或染色体的DNA片段,以质粒多见。接合具有单向性和保守性。单向性指遗传物质只能由供体菌向受体菌单向转移;保守性是指DNA在转移的同时进行复制,即供体菌内的环状双链DNA分子先在一条单链的复制起点处产生一个切口形成单链,此单链DNA通过性菌毛进入受体菌;同时,供体菌和受体菌内的单链DNA均以滚环的方式进行复制形成环状双链DNA分子,使供体菌的DNA转移到受体菌后仍然保留原有的遗传性状。在自然界,接合是异源基因播散最有效的机制,如细菌通过接合传递耐药性和毒力等遗传性状。

如人们已知的那样,在生物膜形成的过程中,菌体先黏附于物体表面,进而使细菌聚集,菌体密度增加形成生物膜。在这个密集聚集的菌群中,细菌间通过接合发生的基因转移可能更易发生。事实上,无论是在自然环境还是在实验室条件下形成的生物膜,都观察到细菌间发生的接合现象。

质粒pB10为一种广宿主范围质粒(broad-host-range plasmid),介导对阿莫西林、链霉素、磺胺类药和四环素的多重耐药。Sedgley将与牙髓感染有关的粪肠链球菌和戈氏链球菌在体外牙根模拟系统中进行生物膜共培养,观察到携带红霉素抗性基因的质粒pAM81在两菌种之间相互转移。将携带四环素抗性的接合性转座子Tn5397枯草芽胞菌株和链球菌共同培养形成生物膜,在生物膜形成的6小时和24小时分离链球菌,链球菌均表现出四环素抗性,DNA序列分析表明链球菌获得了转座子Tn5397。另一项体外生物膜研究显示,存在于齿垢密螺旋体中的梭状质粒可转移到戈氏链球菌中。

牙龈卟啉单胞菌是引起慢性牙周炎的主要病原菌之一。不同牙龈卟啉单胞菌株间广泛存在基因多态性,其中有相当多的基因重排现象,这些基因重排与可移动的基因元件有关,如插入序列、接合性转座子(conjugative transposons,CTns)等。有研究观察到牙龈卟啉单胞菌ATCC33277携带的接合性转座子CTnPg1可转移进入牙龈卟啉单胞菌强毒株W83中。接合性转座子CTnPg1也可由牙龈卟啉单胞菌转移到多形拟杆菌和口腔普雷沃菌。CTnPg1转座子广泛分布于人类口腔厌氧革兰阴性菌中,可能是该质粒在口腔生物膜中间的大量水平转移的结果。同样广泛存在于口腔链球菌中介导四环素耐药的接合性转座子Tn916,也是该质粒在口腔生物膜中大量水平转移的可能结果。

三、噬菌体与生物膜及基因转移

噬菌体(bacteriophage)是感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的细菌病毒的总称。在噬菌体与细菌相互作用的过程中,可通过转导或溶原性转换等方式介导细菌间基因的水平转移。噬菌体在细胞内复制时,有可能错误地将宿主菌(供体菌)的DNA装入噬菌体内,当它再感染其他细菌(受体菌)时便将供体菌的DNA转入受体菌中,使受体菌获得新的遗传性状,此谓转导(transduction)。溶原性转换(lysogenic conversion)是指整合在宿主菌基因组的噬菌体基因组,即前噬菌体,可使宿主菌的表型发生改变的现象,如溶血性链球菌产生红

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

疹毒素都与溶原性转换有关。

噬菌体裂解游离的单个细菌，噬菌体对生物膜中的细菌也能产生破坏作用。一般认为生物膜菌群分泌的多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等将菌体包绕其中，这些胞外多糖可能会影响噬菌体对细菌的感染。但有研究者发现有的噬菌体携带聚糖酶基因，其可分解生物膜菌群周围的胞外多糖，进入生物膜深层，侵入细菌而导致细胞溶解。研究者观察到T4噬菌体颗粒在生物膜中呈放射状“运动”，逐渐感染整个生物膜中的细菌并产生裂解作用。肺炎链球菌携带的前噬菌体编码的溶菌酶Cpl-1和Cpl-7，也可破坏该菌生物膜的形成，对与肺炎链球菌同一种属的假肺炎链球菌和口腔肺炎链球菌的生物膜也产生破坏作用。有学者分离出一株对伴放线杆菌敏感的噬菌体，该噬菌体可裂解伴放线杆菌的生物膜。噬菌体在裂解生物被膜菌群的同时，也会介导细菌间基因的水平转移。

噬菌体作为细菌的特异性病毒，用于治疗细菌感染已有成功案例。鉴于噬菌体对细菌生物膜的破坏作用，噬菌体被认为是控制生物膜感染的一种有效方法。如空肠弯曲菌毒性噬菌体可破坏空肠弯曲菌生物膜；噬菌体可阻碍铜绿假单胞菌在医用导管上形成生物膜。有学者尝试以噬菌体提高生物膜菌群对抗菌药物的敏感性，尤其在针对耐药菌的药物敏感性。当噬菌体与环丙沙星联合使用时，可以减低或限制肺炎克雷伯菌的耐药突变，提高该菌的药物敏感性，还可提高菌株对小鼠吞噬细胞的敏感性。Timothy等人对M13mp18噬菌体进行改造，使其大量表达SOS DNA修复系统抑制物，将改造的噬菌体与氧氟沙星共同作用于大肠埃希菌，不仅削弱了生物膜的形成能力，还可降低细菌耐药性。还有学者利用温和性噬菌体使宿主菌发生溶原性转换的特性，将前噬菌体插入或整合到宿主菌与生物膜形成相关的基因组中使其突变，从而影响细菌生物膜的形成。噬菌体作为防控生物膜的武器应用于临床治疗和控制细菌性感染，还有很多问题需要解决，如噬菌体的宿主谱窄特异性强、噬菌体被免疫系统排除及安全性等。

（徐欣　李明云　杨维青）

参考文献

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol, 2005, 43:5721-5732
2. Apolonio AC, Carvalho MA, Ribas RN, et al. Production of antagonistic substance by *Eikenella corrodens* isolated from the oral cavity of human beings with and without periodontal disease. J Appl Microbiol, 2007, 103:245-251
3. Azeredo J, Sutherland IW. The use of phages for the removal of infectious biofilms. Curr Pharm Biotechnol, 2008, 9:261-266
4. Bonot S, Merlin C. Monitoring the dissemination of the broad-host-range plasmid pB10 in sediment microcosms by quantitative PCR. Appl Environ Microbiol, 2010, 76:378-382
5. Castillo-Ruiz M, Vines ED, Montt C, et al. Isolation of a novel *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype b bacteriophage capable of lysing bacteria within a biofilm. Appl Environ Microbiol, 2011, 77:3157-3159
6. Hannan S, Ready D, Jasni AS, et al. Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 59:345-349
7. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, et al. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 2002, 66:486-505

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

8. Kreth J, Merritt J, Shi W, et al. Co-ordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. Mol Microbiol, 2005, 57: 392-404

9. Kreth J, Merritt J, Shi W, et al. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and Streptococcus sanguinis in the dental biofilm. J Bacteriol, 2005, 187: 7193-7203

10. Kreth J, Merritt J, Zhu L, et al. Cell density- and ComE-dependent expression of a group of mutacin and mutacin-like genes in *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett, 2006, 265: 11-17

11. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. J Bacteriol, 2008, 190(13): 4632-4640

12. Li YH, Tang N, Aspiras MB, et al. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. J Bacteriol, 2002, 184: 2699-2708

13. Liu Y, Burne RA. The major autolysin of *Streptococcus gordonii* is subject to complex regulation and modulates stress tolerance, biofilm formation, and extracellular-DNA release. J Bacteriol, 2011, 193: 2826-2837

14. Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106: 4629-4634

15. Merritt J, Kreth J, Shi W, et al. LuxS controls bacteriocin production in *Streptococcus mutans* through a novel regulatory component. Mol Microbiol, 2005, 57: 960-969

16. Naito M, Sato K, Shoji M, et al. Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer. Microbiology, 2011, 157: 2022-2032

17. Narisawa N, Kawarai T, Suzuki N, et al. Competence-dependent endogenous DNA rearrangement and uptake of extracellular DNA give a natural variant of *Streptococcus mutans* without biofilm formation. J Bacteriol, 2011, 193: 5147-5154

18. Nes IF, Diep DB, Holo H. Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus. J Bacteriol, 2007, 189: 1189-1198

19. Palmer RJ Jr, Diaz PI, Kolenbrander PE. Rapid succession within the Veillonella population of a developing human oral biofilm *in situ*. J Bacteriol, 2006, 188: 4117-4124

20. Sedgley CM, Lee EH, Martin MJ, et al. Antibiotic resistance gene transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in root canals of teeth *ex vivo*. J Endod, 2008, 34: 570-574

21. Shao H, Demuth DR. Quorum sensing regulation of biofilm growth and gene expression by oral bacteria and periodontal pathogens. Periodontol 2000, 2010, 52: 53-67

22. Shelburne SA, 3rd, Sumby P, Sitkiewicz I, et al. Central role of a bacterial two-component gene regulatory system of previously unknown function in pathogen persistence in human saliva. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102: 16037-16042

23. Spoering AL, Gilmore MS. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. Curr Opin Microbiol, 2006, 9: 133-137

24. Sztajer H, Lemme A, Vilchez R, et al. Autoinducer-2-regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the luxS mutation. J Bacteriol, 2008, 190: 401-415

25. Tong H, Chen W, Merritt J, et al. *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H_2O_2: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. Mol Microbiol, 2007, 63: 872-880

26. Tribble GD, Rigney TW, Dao DH, et al. Natural competence is a major mechanism for horizontal DNA transfer

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. mBio,2012,3:e00231-11

27. Tsang P,Merritt J,Nguyen T,et al. Identification of genes associated with mutacin I production in *Streptococcus mutans* using random insertional mutagenesis. Microbiology,2005,151:3947-3955

28. Verma V,Harjai K,Chhibber S. Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment. J Antimicrob Chemother, 2009, 64: 1212-1218

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第八章

牙菌斑生物膜微生态境

牙菌斑生物膜是形成于牙面上的、以细菌为主的微生态环境，是由微生物群与其环境共同构成的功能性生态系统。牙齿、获得性膜、牙菌斑生物膜细菌及其基质、唾液因子和外源性食物是该系统主要的生态因子。生态菌斑学说认为龋病、牙周病的产生是因为环境因素改变，牙菌斑生物膜生态平衡失调所致。因此，从生态学的角度认识牙菌斑生物膜的微生态境，认识其各种生态因子的相互作用、平衡及失调，有助于动态认识牙菌斑生物膜的致病性。

第一节　唾液获得性膜

牙菌斑生物膜形成是发生在牙面上十分复杂的生态学过程，唾液获得性膜的形成是牙菌斑生物膜微生态境形成的第一步，为口腔微生物在牙齿表面的黏附定植奠定了重要的基础。

一、获得性膜的形成

获得性膜是唾液糖蛋白选择性黏附在牙齿表面形成的一薄层无细胞、无结构的有机膜，厚度约 1～10μm。当牙面彻底清洁并排除可能存在的有机物质后，与唾液接触，几秒钟内唾液糖蛋白便可以黏附其上（图 8-1）。

釉质的主要成分为羟基磷灰石（HA）。在牙面羟基磷灰石的表层，排列着大量的磷酸基团及钙离子。由于部分钙离子被体积大的磷酸基团覆盖，所以牙面的净电荷为负。任何带电表面一旦浸入液体中，就立即吸引相对电荷，形成水合层（hydration layer on stern layer）。浸入唾液中带电荷的釉质表面立即就有水合层形成，含钙离子 90%，磷酸基团 90%。当釉质与唾液接触时，釉质表面的电荷立即被一层相反电荷离子中和。用放射物质标记进行细菌黏附现象观察发现，酸性蛋白质与水合层的钙离子相互作用，而碱性蛋白质的正离子与带负电荷的磷酸基团连接。这样就形成了牙面水合层与唾液蛋白的静电作用。

获得性膜形成是一个复杂的生态过程，确切机制尚不清楚。现有研究认为与以下因素有关：①口腔微生物产生的有机酸可以促进唾液中糖蛋白吸附于牙齿表面；②釉质表面的物理性质：釉质的钙离子与电荷相反的唾液蛋白大分子之间的静电吸引过程，使糖蛋白吸附于牙面；③釉质表面的化学性质：釉质是一种碱性物质，唾液蛋白是酸性物质，这样就容易形成钙与蛋白的络合物。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

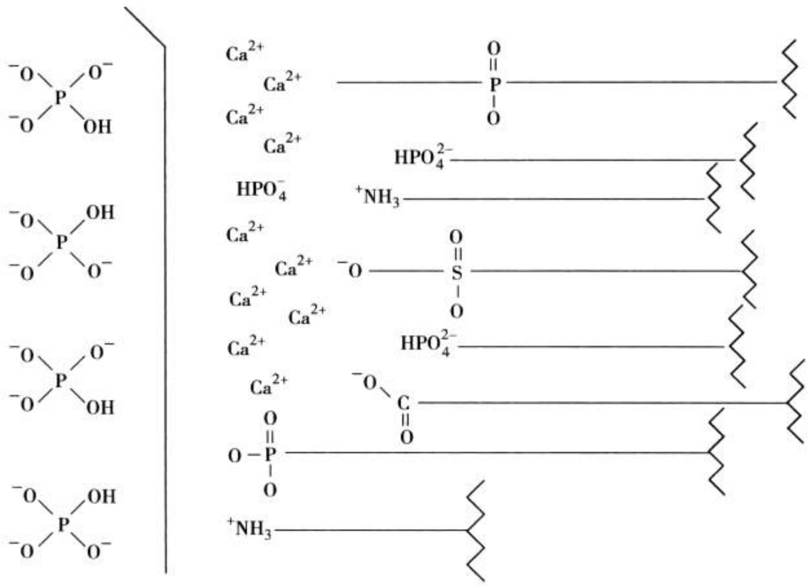


图 8-1 获得性膜的形成

二、获得性膜的组成

虽然唾液获得性膜来自唾液，但其成分不完全同于唾液。获得性膜中碳水化合物重量的50%来自葡萄糖。唾液糖蛋白中仅含少量的葡萄糖，获得性膜中葡萄糖主要源于细菌细胞内、外多糖的代谢。除葡萄糖外，获得性膜中还有麦芽糖、半乳糖、己糖胺、己糖、岩藻糖和涎酸。

获得性膜中蛋白质含量和种类较多，所含的蛋白质主要是磷酸糖蛋白，其次是淀粉酶、溶菌酶、GTF、IgG及清蛋白等。获得性膜含有大量的酸性氨基酸，如谷氨酸、脯氨酸、丝氨酸、甘氨酸和酪氨酸。碱性氨基酸含量较少。

获得性膜含有25%的脂类物质，组成同唾液相似，有磷脂、糖脂和中性脂，各种脂的比例不同，唾液以中性脂为主而获得性膜中糖脂占多数。

三、影响获得性膜成分的主要因素

牙齿表面化学成分不同，获得性膜的成分也不同。釉质、牙骨质和不同充填材料表面形成的获得性膜成分是有差异的，这种差异与其表面化学成分有关。牙骨质表面含有较多的磷酸基团，比釉质有更强的负电荷，吸附的酸性富脯蛋白也较釉质多。

早期获得性膜(2小时)的成分与晚期获得性膜的成分是不完全相同的，磷蛋白在获得性膜成熟时就开始减少。

对抗龋者和龋易感者2小时获得性膜的脂质分析表明，两组总脂质和糖脂含量相似，抗龋组中性脂和磷脂含量明显低于龋易感组。在中性脂中，抗龋组的胆固醇、胆固醇酯含量高于龋易感组，但游离脂肪酸较少。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

四、获得性膜的生物学作用

获得性膜是牙菌斑生物膜微生态系的形成基础。获得性膜一经形成，就改变了牙齿表面的生态环境，并行使其生物学功能。

1. 确定首先定植在牙面上的细菌种类，影响细菌对牙面的黏附　获得性膜的形成改变了牙齿表面原有的性能，从而影响微生物表面黏附和定植。获得性膜中的一些成分是微生物的特异受体，有利于微生物黏附，也可遮蔽一些细菌的受体，减少这些细菌的黏附。最早在获得性膜表面黏附的细菌是血链球菌，而不是变异链球菌，说明其表面有促进血链球菌表面黏附的受体。

2. 细菌的营养来源　获得性膜中含丰富的蛋白质、碳水化合物，可以作为黏附在其表面细菌的代谢底物，牙菌斑生物膜深层细菌也可以利用这些营养物质来维持正常新陈代谢。

3. 在牙齿表面形成离子保护库　获得性膜中所含的蛋白质、氨基酸可结合钙、磷、氟等矿物质，有利于牙面的矿化和再矿化。

4. 保护釉质表面　牙面上形成一层有机膜，可以减少釉质对酸的敏感性。釉质龋早期出现表层下损害，而表层相对完整的特殊病理改变，可能与获得性膜的保护作用有关。

第二节　牙菌斑生物膜的形成

获得性膜形成后，细菌很快就黏附其表面，生长、繁殖，形成小菌落，同时细菌相互聚集，构成牙菌斑生物膜微生态系形成的必要条件。

一、细菌黏附与定植

细菌主要通过 Ca^{2+} 的静电作用黏附在获得性膜的表面。获得性膜中糖蛋白所带的磺酸基团（$-SO_3$）和羧基（-COOH）带负电荷，细菌细胞壁中磷壁酸的终末磷酸基因（$-PO_3$）带负电荷，通过 Ca^{2+} 的桥梁作用连接，使细菌黏附到牙齿表面。

细菌产生的细胞外多糖与获得性膜中糖蛋白的羟基之间的氢键作用增强了对获得性膜的黏附。同时，细菌表面的疏水蛋白与获得性膜中的疏水基团结合对细菌的黏附同样具有促进作用。一般来说，疏水性越强的细菌黏附力越强。获得性膜的疏水性与脂质含量有关，脂质增加获得性膜的疏水性。

黏结素是指细菌表面与黏附有关的成分，受体则是宿主表面与黏结素起作用的成分。细菌表面的黏结素以立体化学的特异方式结合到组织表面的补体分子或受体上。特异性结合使细菌牢固地黏附在牙齿表面。多数黏结素是植物凝结素，主要存在于细菌表面的附属器（如菌毛）中，也存在于黏蛋白和各种表面结合酶（如 GTF）中。不同的细菌具有不同的黏结素，不同的黏结素调节细菌对不同牙面的黏附。

一种细菌附着于另一种细菌表面称为聚集。细菌聚集通过自身合成产物、与宿主聚合物和直接黏附三种形式实现。细菌间通过自身合成的细胞外聚合物而相互黏附，牙菌斑生物膜中变异链球菌之间的黏附就与变异链球菌合成的细胞外葡聚糖有关。细菌与宿主的聚合物相互作用，使细菌容易集聚在牙菌斑生物膜中。血链球菌和轻型链球菌与唾液中的糖蛋白、类黏蛋白、清蛋白等聚合物相互作用，促进了细菌在牙菌斑生物膜中集聚。不同种细

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

菌直接黏附在一起，形成了牙菌斑生物膜中"栅栏"、"谷穗"样集聚，球菌、杆菌直接黏附在丝状菌菌体表面（图 8-2、图 8-3）。



图 8-2　栅栏状结构

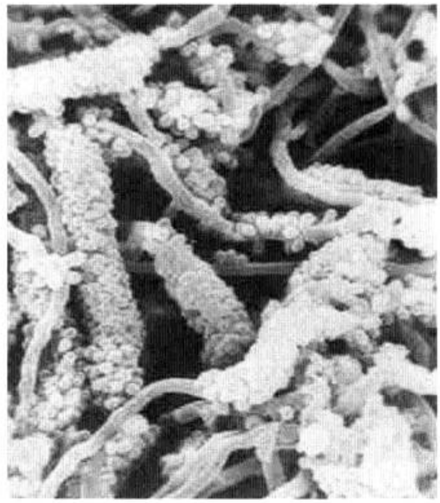


图 8-3　谷穗状结构

细菌黏附和聚集是牙菌斑生物膜微生态系形成的重要部分。细菌表面的黏结素所调节的细菌对不同表面的黏附，是影响牙菌斑生物膜微生态系菌群组成复杂性、多样性的重要因素。

在黏附过程中，除细菌表面特异的蛋白样成分外，还有许多因素影响细菌黏附。例如，许多牙菌斑生物膜微生物能合成细胞外水不溶性葡聚糖。细胞外水不溶性葡聚糖的生态作用之一是参与牙菌斑生物膜基质构成，介导细菌对牙面或细菌之间的不可逆性黏附。葡糖基转移酶（GTF）是细菌细胞外酶，作用于蔗糖分子，催化细胞外葡聚糖合成。GTF 酶能黏附到羟基磷灰石、获得性膜表面，处于黏附状态的酶仍具有生物活性，有效地合成葡聚糖，辅助细菌对这些表面的附着。

细菌间的直接黏附作用使缺乏黏附力的细菌参与牙菌斑生物膜生态系。韦荣菌不能直接黏附到玻璃表面，能黏附到已有的黏性放线菌上；产黑色素拟杆菌能黏附到放线菌、链球菌细胞上。革兰阳性菌对革兰阴性菌在牙面的定居起了重要作用。谷穗结构是牙菌斑生物膜中细菌黏附的典型例子。

唾液糖蛋白选择吸附于牙齿表面形成获得性膜。糖蛋白，特别是其中的酸性富脯蛋白对细菌在牙面的黏附起促进作用。糖蛋白作为牙菌斑生物膜中许多细菌的牙面受体，促进细菌在牙面定居。唾液中含钙量约为 1 ~ 2mmol，钙通过辅助唾液糖蛋白黏附到羟磷灰石上、减少细菌表面的负电荷、减弱对细菌的排斥力、活化细菌细胞表面的葡聚糖受体等作用促进细菌黏附和牙菌斑生物膜的形成。

细菌黏附与定植的生物学机制见第五章。

二、牙菌斑生物膜的成熟

牙菌斑生物膜成熟是一个动态变化过程，在这个过程中，微生物的组成与比例以及生物

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

膜结构都在不断地变化，以适应生态环境的改变，最终发育成为成熟的牙菌斑生物膜微生态系。

牙菌斑生物膜中微生物的组成是动态变化的。牙菌斑生物膜成熟的一个重要生物学特征就是微生物组成的变异性。早期牙菌斑生物膜中需氧菌数目较多，随着牙菌斑生物膜的增龄，厌氧菌数目增加，早期牙菌斑生物膜组成细菌的相对比例下降。

牙菌斑生物膜结构同样也是动态变化的：刚形成的牙菌斑生物膜结构比较疏松，随着牙菌斑生物膜逐渐成熟，细菌逐渐排列紧密，基质形成一致密的蛋白多糖网，有限空隙可供小分子生物通过，大分子被排斥在外，牙菌斑生物膜的物质代谢随之发生了变化。牙菌斑生物膜的厚度和密度增加，渗透性下降，牙菌斑生物膜的生态条件随之改变，牙菌斑生物膜结构重组，形成成熟牙菌斑生物膜的特征性结构——栅栏状结构：丝状菌彼此平行并与牙面呈垂直排列，形成栅栏，球菌和杆菌分散其间。栅栏状结构的形成有利于牙菌斑生物膜深层细菌获得营养和氧，同时增大了细菌的黏附面积。牙菌斑生物膜成熟一般需 7 天左右。

成熟龈上牙菌斑生物膜按其致病性的不同可以分为致龋菌斑和非致龋菌斑。这两种牙菌斑生物膜的细菌种类差异不大，但各种细菌所占比例不同。与非致龋菌斑相比，致龋性菌斑中变异链球菌族较多，而非致龋菌斑中血链球菌、韦荣菌较多。致龋性菌斑多位于牙齿的咬合面和邻面。其生态学特征是：变异链球菌数量多；对蔗糖利用快，且产乳酸为主；含更多的细胞内多糖合成菌，接触蔗糖 15 分钟内，20% 以上转化为细胞内多糖；合成细胞外多糖是非致龋性菌斑的 2 倍，分解这种多糖可产生更多的有机酸。

第三节　牙菌斑生物膜中微生物群落

口腔微生物超过 700 种，这些微生物在牙菌斑生物膜中不是简单的叠加，而是通过黏附、聚集定植，形成群落，产生群落反应，这些反应在单独研究时是无法观察到的。

一、口腔微生物群落的早期研究

van Leeuwenhoek（1632—1723）最早开始研究口腔微生物。他在 3 天未清洁的前牙牙龈上方发现一些活着的微小生物，并绘制这些微小生物的草图，标志着口腔微生物群落研究的开始。

W. D. Miller 研究发现龋齿发生与唾液中的细菌有着密切的关系。1890 年，他出版《人类口腔中的微生物》著作，第一次提出龋齿病因的化学细菌学说，认为当摄入可发酵糖类后牙菌斑生物膜微生物可将这些糖类转化为有机酸，导致牙齿脱矿。Miller 提示了牙菌斑生物膜在人口腔疾病发生中的病原性，提出去除菌斑是龋齿治疗的基础。

1924 年，J. K. Clarke 对变异链球菌的初次分离。最近的以 16S rRNA/DNA 为基础的大量口腔研究，已发现了人类口腔中超过 700 种细菌（革兰阳性菌、革兰阴性菌、古细菌），使得口腔微生物群落成为人类最复杂的微生物集群之一。

二、微生物群落的相互作用

营养供给是决定牙菌斑生物膜微生物群落组成的一个重要因素。为了适应特殊的环境（如口腔），微生物发展出了可以有效利用这种生态微环境中的营养物质的代谢途径。牙菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

斑生物膜微生物群落的营养物质来源于食物的周期性摄入、唾液、其他微生物的代谢产物以及菌斑多糖。当膳食中具有大量蔗糖时，变异链球菌相对于其他细菌可能会具有竞争优势。变异链球菌比其他细菌更高效地代谢蔗糖，将蔗糖快速转化为乳酸，具有很强的耐酸性。变异链球菌将蔗糖转化为黏性葡聚糖分子的能力也促进对牙齿的黏附。缺乏这种能力的细菌则会被葡聚糖无差别捕获，并参与牙菌斑生物膜的发育。

牙菌斑生物膜微生物群落的另一个重要营养来源是唾液及龈沟液中的蛋白质，由宿主组织及细菌产生。当唾液蛋白质成为有限的营养来源之一时，能够水解蛋白质的微生物便具有竞争优势。牙菌斑生物膜中两种生物间的协同或互惠作用对唾液的依赖已经由内氏放线菌和口腔链球菌证实。在唾液包被表面，任何一种细菌单独定植都很困难，可是两者一起却可以在同一表面上形成广泛的生物膜。这可能是由于两者对唾液成分联合代谢作用的结果。共生关系的微生物在生物膜中是应该紧密相邻的。

一种生物的代谢产物很可能对同一生物膜中其他细菌产生影响。具有较高比例变异链球菌的菌斑往往血链球菌的水平会被抑制。前者可将蔗糖代谢为乳酸，这是细菌代谢酸中酸性最强的一种。相对于血链球菌，变异链球菌具有更强的耐酸性，乳酸更有利于变异链球菌的生存。血链球菌则可以代谢产生过氧化氢，对包括变异链球菌在内的其他共生菌具有拮抗作用，因为它们没有能有效代谢这种有毒物质的系统。许多厌氧菌也对氧化物敏感。因此，血链球菌水平相对较高的牙菌斑生物膜，变异链球菌水平及牙周炎相关菌(如牙龈卟啉单胞菌)水平则较低。牙菌斑生物膜中血链球菌的存在与牙周致病菌低水平相关，有助于口腔健康。

一种生物的代谢产物也可以促进种群间的生长。变异链球菌产生的乳酸可以被韦荣球菌稳定代谢。牙菌斑生物膜形成的早期可以观察到韦荣球菌。最近研究发现，寡发酵链球菌亦可代谢变异链球菌产生的乳酸。寡发酵链球菌最初从无龋人群口腔中分离，其在牙菌斑生物膜中的数量增加与变异链球菌数量呈负相关。这种非致龋链球菌还能抑制变异链球菌的生长。这种抑制作用的机制非常独特。寡发酵链球菌通过乳酸酶的作用将变异链球菌产生的乳酸这种在通常情况下是生长抑制剂的物质转化为过氧化氢，过氧化氢则对变异链球菌具有高度毒性。

牙菌斑生物膜群落之间存在合作代谢现象。一些种属的细菌可以改变局部微环境，使其有利于其他种属细菌的生长。具核酸杆菌和中间普雷沃菌可以在 pH 5.0~7.0 的较宽范围内生存，牙龈卟啉单胞菌则不能在 pH 低于 6.5 的环境中生存。Takahashi 研究发现，使用谷氨酸和天门冬氨酸者两种唾液中的主要氨基酸作为饲养底物，具核酸杆菌和中间普雷沃菌可以产生有机酸和氨，使 pH 值即使在产乳酸细菌和可发酵糖类存在的情况下也不至于剧烈下降，保护酸敏感细菌免受酸攻击。

微生物代谢中产生的氧气、二氧化碳等气体可以影响牙菌斑生物膜细菌相互作用，代谢氧的细菌有利于厌氧菌的生存。

三、微生物群落的致病机制

根据 Koch 的假说，对口腔微生物群落分离和鉴定使微生物学家将特定微生物种属与特定疾病联系起来。目前认为，牙菌斑生物膜中产酸的变异链球菌与龋病有关。医学上的病原体都是“外来者，具有特殊的毒力因子”，变异链球菌则不同，它是口腔正常菌群的一部分，

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表达一定的病原因子(如产酸),却与邻近的细菌通过协同或拮抗的相互作用达到动态平衡,并不造成损害。在复杂的牙菌斑生物膜群落中,不是由单种细菌的行为决定了整个群落的复杂行为,而是由微生物群落的相互作用来决定。当与邻近的产碱细菌一起时,变异链球菌对宿主可能并不具有病原性。因此,龋病并不是仅由变异链球菌或其他任何一种菌斑中的细菌单独引起的,而是牙菌斑生物膜中各种产酸菌相互作用的结果。这个以群落和微生物生态为基础的病原理论为理解牙菌斑生物膜与宿主健康或疾病的关系提供了新的视角,也为疾病预防及治疗提供了新的手段。

口腔具有复杂的多种属微生物群落。在形成牙菌斑生物膜结构、生理功能和致病的过程中,群落成员间应具有广泛的相互作用。这些相互作用包括营养竞争、生存的协同作用、拮抗作用、毒力因子的中和作用、生长依靠信号机制干扰等。

四、细菌素对微生物群落的作用

细菌可以产生对其他细菌具有特异性或非特异性作用的产物,如细菌素。细菌素是所有主要种系的细菌都可产生的蛋白质毒素。与抗生素不同,细菌素的杀菌谱较窄,只对相关细菌起作用。口腔链球菌产生细菌素的能力最强。许多口腔链球菌都可以产生肽类细菌素。变异链球菌至少可以产生 5 种细菌素:变链素Ⅰ～Ⅴ。变链素Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ属于含羊毛硫氨酸的乳链菌肽,抗菌谱相对较宽;变链素Ⅳ、Ⅴ则是未修饰的非乳链菌肽;变链素Ⅳ对轻链球菌家族成员作用特别活跃。一项最近的变异链球菌 UA159 菌株基因组研究表明其含有至少 9 个变链素编码推定基因,提示了变异链球菌可作用于其竞争者的全部手段或“武器储备”。许多研究提示,变链素的作用与变异链球菌在口腔生物膜中的普遍存在与成功定植是相关的。一些细菌素也可抑制血链球菌的生长,这可能是变异链球菌水平较高的菌斑中血链球菌水晶则较低的原因之一。因此,一些生物膜成员的细菌素表达可能决定了其共生菌的种类。

细菌素也可通过作为信号分子相似物发挥作用来影响种群间的相互作用。例如,酿脓链球菌和唾液链球菌产生的羊毛硫细菌素在结构上彼此相似,并可与彼此的双组分信号系统相互作用。这两种细菌均可在黏膜表面定植,并通过拮抗生长依赖性信号转导抑制对方的生长。因此,共生的唾液链球菌可以阻止具有毒力的酿脓链球菌形成生物膜。

其他的抗微生物成分也可对一些细菌的信号转导系统产生作用。这类物质包括生长抑制因子。在亚致死浓度下,没有观察到它们对信号转导的作用。这种相互作用就可以影响毒力的生物膜依赖基因的表达。

分子生物学和分子遗传学研究显示,细菌素的产生是受到严格调控的,受环境因素(如细胞密度、营养供给、pH 值以及遗传因素)的共同影响。这些调节系统确保细菌素在恰当的时间和部位产生,有效地在牙菌斑生物膜微生物群落的生态平衡中发挥作用。

群落的稳定只有在同一生物环境中的不同种群间达到生态平衡才能获得,往往是生物群落中生态活动的结果。口腔细菌产生并对细菌素和细菌素样物质敏感,使得细菌能够选择自己的“邻居”,促进了特定种属细菌群落的建立,在牙菌斑生物膜生态系中微生物群落之间的生态平衡中发挥重要的作用。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

第四节　牙菌斑生物膜的微结构

牙菌斑生物膜是口腔细菌致病的重要微生态环境。现代龋病病因学认为，牙菌斑是典型的生物膜结构，是龋病发生的始动因子。研究表明生物膜中细菌的抗药性及各种生化代谢效率均显著高于体外培养游离细胞。生物膜对宿主防御系统有较强的抵抗力，耐受性强，对抗生素敏感性下降，具有空间和环境的多样性，能表达不同于浮游细菌的表型，抵抗水流的冲刷等特点。作为单细胞的生命形式，细菌在长期以来的研究中始终以游离于液体培养基中的单细胞状态作为研究对象，在最大程度上简化了外界环境的影响，也获得了大量的研究成果，为现代微生物学的研究奠定了基础。在自然状态下，细菌很少以纯培养游离形式存在，生物膜是细菌最常见的生态环境。因此，弄清细菌生物膜的微结构、化学成分及其在生理病理状态转变中的变化非常重要。

一、口腔天然环境内生物膜微观结构

口腔生物膜是一个附着于牙面或种植体表面的细菌微生态三维结构。对口腔生物膜复杂结构的认识最早始于 listgarten 和其合作者的研究，他们运用光学显微镜和电子显微镜对附着于牙齿表面的生物膜进行了观察。他们发现在牙龈上方形成的生物膜有着与牙齿表面相垂直的柱状微菌落结构。革兰阳性球菌在最初的生物膜形成过程中，是这些微菌落的主要菌种，一些分枝杆菌在随后的 1～2 天中开始出现，1 周后，杆菌出现在生物膜的柱状结构上方。在随后的 3 周时间里，生物膜内的球菌逐渐被丝状杆菌代替。杆菌成为成熟菌斑中的主要菌种。一层被称作“玉米束”的结构松散的附着在 3 周的生物膜上，这些“玉米束”被看作是细菌的聚集体，此聚集体以杆菌为中心，周围附着以球菌。在 2 个月的生物膜结构观察中发现，2 个月的生物膜保持着与 3 周生物膜的相同结构。在牙菌斑生物膜中检测到螺旋体，该菌种主要出现在牙龈组织周围，形成一个模糊层覆盖在菌斑表面。光学及电子显微镜最大的弊端在于无法区别细菌的种类，运用原位杂交技术，首次观察到牙菌斑生物膜的初始附着是变异链球菌和放线菌间共聚和黏附的结果。在 7 天的生物膜中，链球菌的比例逐渐下降，fusobacteriumnucleatem 的比例逐渐增加。将生物膜形成的载体放置到牙龈沟中，运用两种探针在此生物膜中发现了一组口腔 treponemes 和其他已知的口腔细菌。Vincent zijnge 等在 2010 年发表的文章中，更加完善了原位杂交技术在口腔生物膜细菌种类及微生物结构的应用，该研究组用了 29 种自行设计的探针，对口腔环境内形成的生物膜进行标记，运用激光共聚焦显微镜获得天然牙齿表面生物膜结构。

Vincent zijnge 等发现，在龈下菌斑的结构中，按照细菌形态和荧光强度的不同，主要分成 4 层结构（图 8-4）。在生物膜的最上方是由荧光强度与细胞相似的细菌组成，在所有测试的探针中，只有放线菌被标记在这层结构里。

中间层生物膜是由束装细菌所组成，包括核梭杆菌等，在上层和中层的细菌主要属于 cytophaga-flavobacterium-bacteroids 集合体（CFB-cluster）和丝状、杆状菌。除了 CFB-cluster 类细菌，大型“雪茄”类细菌也在上层生物膜中检测到。在生物膜以外存在一种无明确细菌组织的结构，被称为第四层结构，螺旋体是该层结构的主要菌种。

龈上菌斑比龈下菌斑具有更一致的结构，主要有两层结构，黏附于牙齿表面的基底层

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

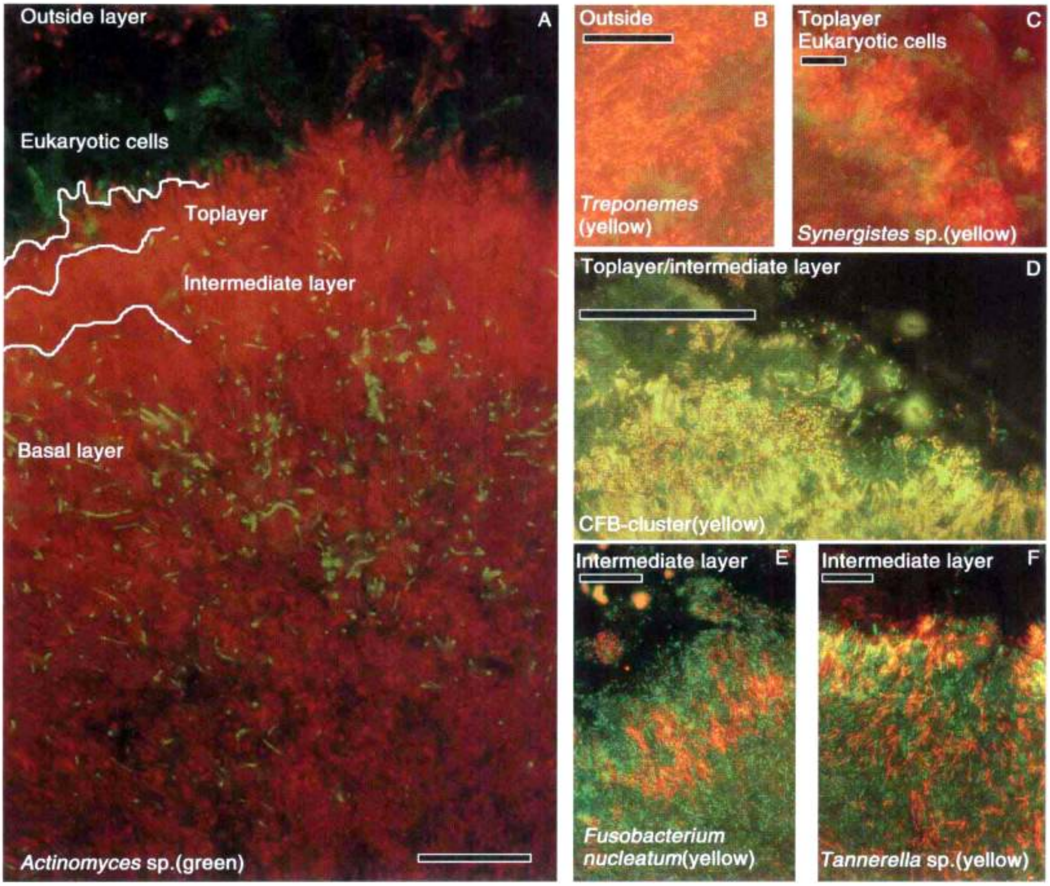


图 8-4　龈下菌斑中主要细菌分布

注：A. 龈下菌斑图片，放线菌（绿色），细菌（红色），真核细胞（在顶端的绿色细胞）；B. 位于生物膜外的螺旋体（黄色）；C. 位于真核细胞（绿色）上层的 Synergistetes（黄色）；D. 位于上层和中间层的 CFB-cluster（黄色）；E. 位于中间层的 *F. nucleatum*；F. 位于中间层的 *Tannerella sp.*（黄色）。每个长度标记是 10μm。此图来源于：Zijnge V，van Leeuwen MB，Degener JE，et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. PLoS One，2010，5（2）：e9321. Figure 2

及四种不同的生物膜形态（图 8-5），放线菌垂直地黏附在牙齿表面；第二类是放线菌和链球菌的混合结构，与牙面相垂直；第三类是丝状菌、链球菌及酵母菌，在这种结构中，链球菌形成了围绕酵母菌的微菌落；第四类结构主要由链球菌和乳酸杆菌组成，此结构也与牙面垂直。第二层结构在基底层的上方，链球菌非常均匀地分布在这层结构中，并且没有形成明显的结构，这种均匀分布的细菌也属于 CFB-cluster 类。最后一种形态是乳杆菌，该细菌朝着远离牙面的方向，并且被许多不同的形态结构的细菌附着围绕。该研究首次在体内鉴定到乳酸杆菌是龈下菌斑细菌聚集的中心体，并且首次在龈上菌斑中发现了链球菌和酵母菌形成的玉米束结构，该体内研究为口腔生物膜微生态结构和细菌的垂直纵向分布上提供了新的数据。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

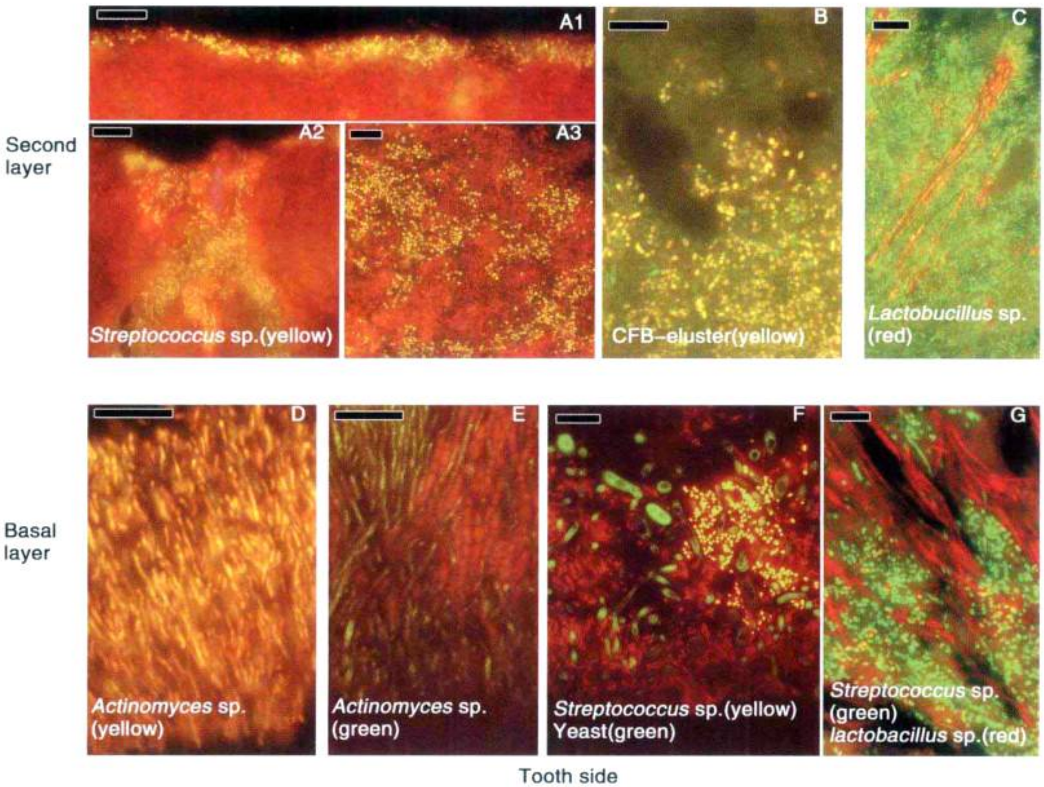


图 8-5 龈上菌斑中主要细菌分布

注：A1. 链球菌（黄色）在生物膜上方形成了一个窄带，包裹于生物膜中（A2）或形成小的细菌分散在生物膜上层（A3）；B. 位于生物膜上层的 CFB-cluster；C. *Lactobacillus sp.*（红色）在生物膜上方形成长条状；D. 放线菌（黄色）附着于牙齿表面；E. 形成早期菌斑的放线菌（绿色）和球菌；F. 多菌种生物膜中的链球菌（黄色）、酵母菌（绿色）和其他细菌（红色）；G. 位于早期生物膜中的链球菌（绿色）和乳杆菌（红色）。每个长度标记是 10μm。此图来源于：Zijnge V，van Leeuwen MB，Degener JE，et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. PLoS One，2010，5（2）：e9321. Figure 3

二、多菌种生物膜三维结构

在过去的二十几年间，细菌生物膜生态学说被用来解释口腔致龋病因。人类的口腔包括至少 600 种细菌，这些细菌形成生物膜附着在牙齿表面，牙菌斑生物膜经历着动态的变化。

1991 年，Marsh 提出牙菌斑生态学说，认为口腔疾病（包括牙周病和龋病）都源于牙菌斑生物膜，当生物膜处于正常生理状态时，牙菌斑生物膜不具有致病性。当环境因素变化，如碳水化合物的摄入、pH 值降低等，牙菌斑生物膜内的口腔菌群比例及代谢产物会发生转变，牙菌斑生物膜则从生理性向病理性转变，引起口腔疾病。一个经典的例子是，当个体摄入低糖饮食时，牙菌斑生物膜菌群组成是稳定的，只有一小部分致龋菌会代谢产酸，但当个体摄入大量高糖饮食时，牙菌斑生物膜会长时间维持在低 pH 值，这种环境因素会促使变异链球菌的增殖，打破菌斑的平衡状态，最终引发龋病。Marsh 的生态学理论中，pH 是唯一的环境

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

因素，单纯的pH并不能解释所有的龋病致病现象。在体内实验中，研究人员发现单纯的葡萄糖饮食会引起pH下降，但却不能引发龋坏。

研究发现，在葡萄糖培养基中只有少量的生物膜形成，而在蔗糖培养基中，尽管pH相似，却有大量的生物膜形成。随着对生物膜胞外多糖研究的深入，PaesLeme等提出在牙菌斑生物膜中胞外多糖与pH有着同等重要的环境因素。细菌生物膜的主要成分为细菌成分和胞外多糖成分，如果将生物膜认为是“细菌的城市”，而胞外多糖则可认为是“细菌的房屋”，胞外多糖通过影响生物膜中通透度、密度、水道、离子分布等因素可影响生物膜整体结构以及细菌在其中的生存状态，因此对生物膜研究十分重要。一些实验运用扫描电镜、激光共聚焦显微镜为手段对生物膜细菌及胞外多糖成分进行了观察，对生物膜生长及代谢过程中成分和结构的变化进行了初步的了解。

关于胞外多糖如何引发牙菌斑生物膜的生态转变机制并不清楚。肖瑾等对此领域进行了深入研究，阐释了在牙菌斑生物膜从生理向病理转变的过程中细菌种群的变化、生物化学组成的变化以及三维结构的变化，并且揭示了该变化引起的生物膜生理功能变化。在体外唾液包被的羟磷灰石模型上建立了口腔多菌种生物膜，包括变异链球菌、唾液链球菌及黏性放线菌。唾液链球菌及黏性放线菌是在口腔早起牙菌斑生物膜中检测到的常驻菌种。

变异链球菌是目前认为与龋病发生关系密切的主要口腔常驻菌，通过对牙面的黏附，合成胞外多糖，介导其他口腔细菌黏附，形成生物膜，其在生物膜中产酸和耐酸的特性又进一步促进了龋病的发生。此模型以口腔生态学理论为基础，0小时将3种细菌按照其在正常口腔中的比例接种到含0.1%蔗糖培养基中，此培养基被认为是正常生理状态，在生物膜培养29小时，生物膜被转移到3种不同的培养基中，模拟环境刺激，其中包括0.1%蔗糖（被认为低致龋性）、1%蔗糖（被认为高致龋性）和1%葡萄糖（作为对照）。在随后的培养中，培养基在每天早上8点和下午6点更换，在不同的时间点，生物膜从培养基中取出进行三维结构的动态观察以及与结构相关的生理功能测试，其中包括首次对生物膜内pH值进行了三维测量及成像，对生物膜抵抗抗生素能力进行了成像观察。

研究发现，在不同的环境刺激因素引入后，细菌种类发生了明显的变化，在0.1%蔗糖（低致龋）组中，在115小时的生物膜培养后，3种细菌的分布相对稳定，比例均匀。在1%蔗糖（高致龋）组中，变异链球菌成为3种细菌种中的主要菌种（图8-6）。但是，在1%葡萄糖对照组中，变异链球菌不是主要菌种，唾液链球菌成为主导。

在对3种不同状态中形成的生物膜三维动态结构的观察，采用荧光染色技术对细菌和细菌外胞外多糖进行了染色，并用激光共聚焦显微镜观察到胞外多糖只出现在蔗糖类培养基里，尤其是在1%蔗糖高致龋性组（图8-7）。在生物膜结构中，鉴定到了一种与致龋性生物膜特异相关的三维结构——胞外多糖细菌微菌落。该微菌种有两种形态，一类是附着于生物膜底层的微菌落结构，与生物膜的水平及垂直生长相关；另一类是游离类微菌落，与生物膜的成熟相关。图8-8生物膜底层的微菌落形成过程进行了详细的展示，阐述了胞外多糖与细菌间的关系，胞外多糖为细菌的附着、聚集提供支持，形成微菌落核心，同时为微菌落在生物膜空间里的纵向生长提供了骨架支持。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

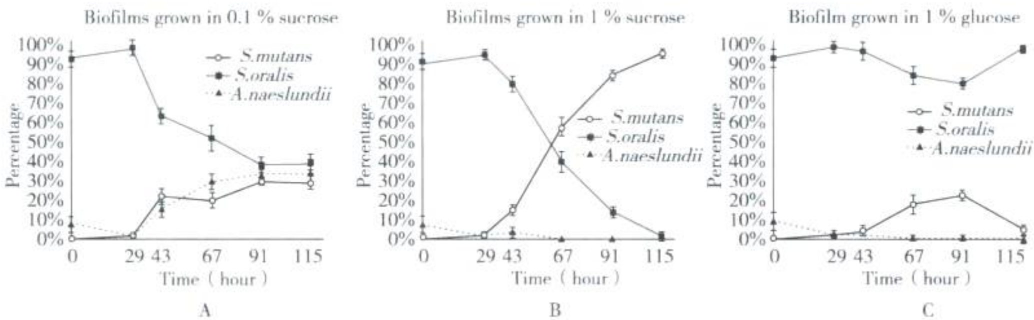


图 8-6　多菌种生物膜细菌种类转变

注：A. 在 0.1% 蔗糖中形成的 115 小时生物膜中，各菌种间比例没有差异；B. 在 1% 蔗糖中形成的 115 小时生物膜中，变链菌成为优势菌群；C. 在 1% 葡萄糖中形成的 115 小时生物膜中，唾液链球菌成为优势菌群。* $P < 0.05$，$n = 12$。此图来源于：Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLoSPathog, 2012, 8(4): e1002623. Figure 1

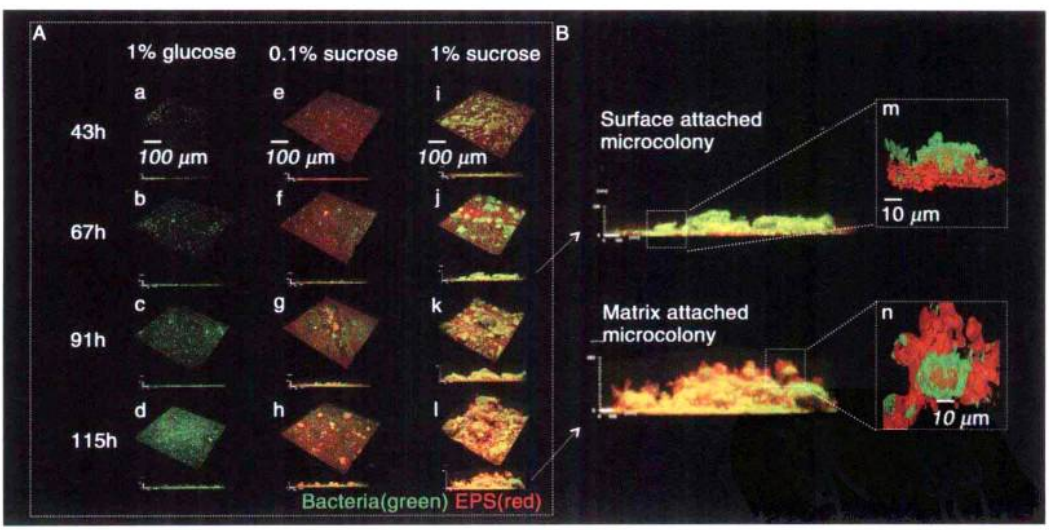


图 8-7　多菌种生物膜三维结构动态变化

注：A. 多菌种生物膜三维结构的动态变化；B. 胞外多糖-细菌微菌落结构。此图修改自：Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLoSPathog, 2012, 8(4): e1002623. Figure 1

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

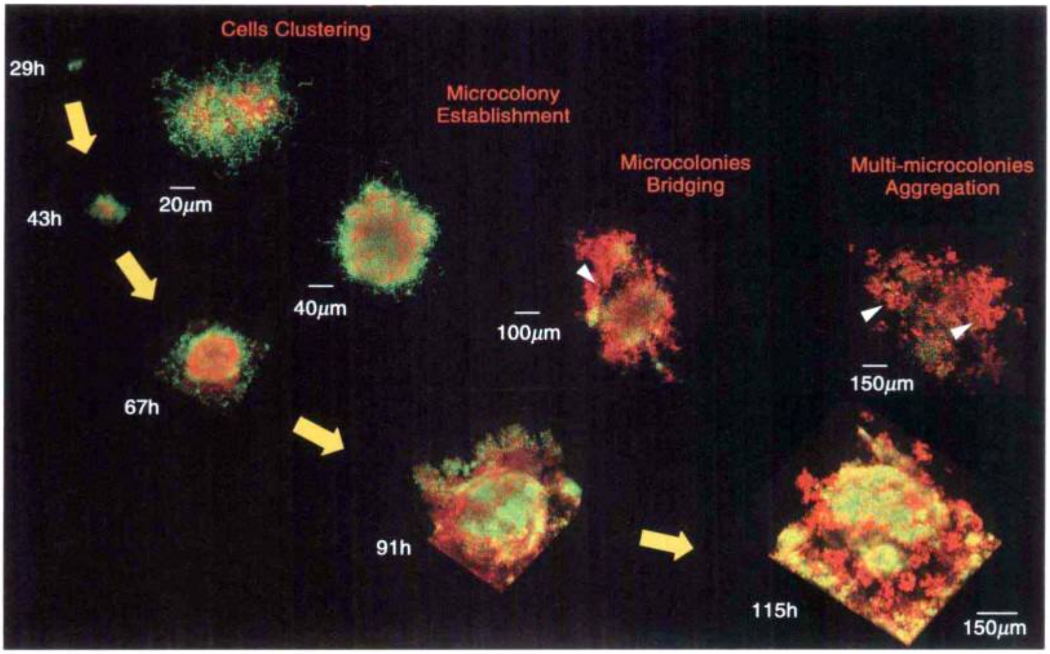
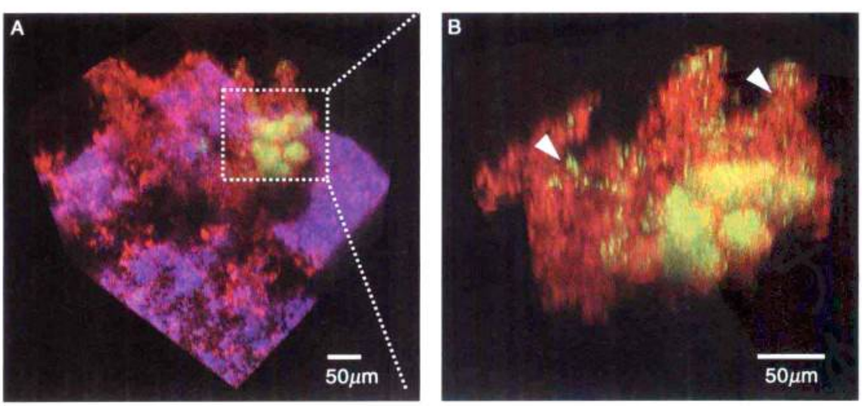


图 8-8　附着型胞外多糖-细菌微菌落的动态形成过程

注：此图修改自：Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLoSPathog, 2012, 8(4): e1002623. Figure 4

图 8-9 三维结构中局部分离出的游离的微菌落，并显示了细菌与胞外多糖的附着关系。胞外多糖在致龋性生物膜的形成中明显地起到了形成底层附着和空间骨架支持的作用。研究表明与胞外多糖形成相关的 GTFs 酶直接或间接地影响生物膜三维形态，在敲除 *gtfb*、*gtfc* 的变异链球菌多菌种生物膜中，生物膜的厚度明显减低，生物膜的三维结构也缺乏完整性。



公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

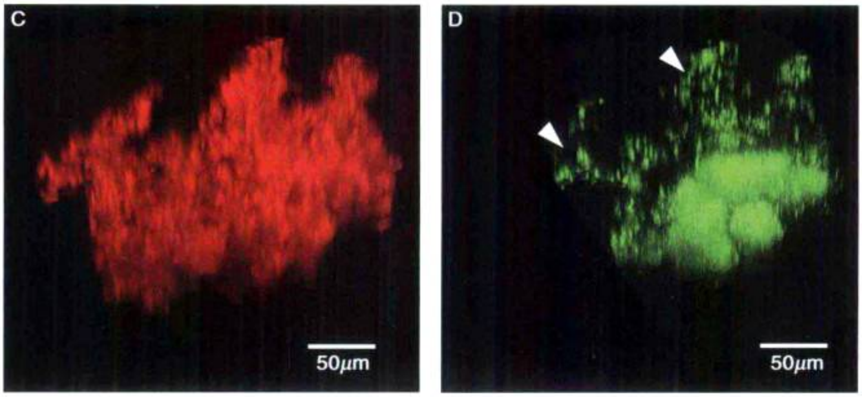


图 8-9 游离微菌落的微观结构

注:图 A 中的虚线框标示了从生物膜三维结构中局部分离出的游离微菌落,图 B、C、D 分别是该结构的放大图,红色为胞外多糖,绿色为细菌

三、多菌种生物膜 pH 三维分布

牙菌斑生物膜中细菌利用碳水化合物产酸,降低牙菌斑生物膜 pH,引起釉质表面脱矿,釉质在口腔生态环境中长时间处于脱矿与再矿化中,当此天平向脱矿偏移时,则引发龋坏。对牙菌斑生物膜 pH 进行的长期深入研究,利用各种测量仪器对其 pH 进行观测,单纯的 pH 测量仪只能获得测量数值,无法全面地了解菌斑 pH 分布。采用 pH 敏感性荧光探针对生物膜内 pH 进行标记,该探针在生物膜形成的过程中结合到生物膜的胞外多糖中,均匀地分布在生物膜中,这种标记技术使得对生物膜 pH 的可视性研究成为可能。

在图 8-10 可见,运用不同深浅的灰色表示 pH 的值,从最暗到最亮分别表示 pH 从 3.5~7的过渡。在 1% 蔗糖中形成的致龋性生物膜中,pH 并非均匀分布的,由于胞外多糖及细菌微菌落的形成,生物膜内存在着 pH 的多形性分布。主要特点是在生物膜与载体(如牙面)相交处存在着低 pH 区,该低 pH 区与微菌落的形成直接对应,图 8-10A 左上角展示了生物膜的三维图,研究人员对生物膜与载体表面相接处的 pH 进行了测量分析,虚线框表出的是研究人员选择的区域 pH 值测量,在生物膜与载体相交面分别对包括和不包括胞外多糖-细菌微菌落的区域进行了测量,在对生物膜进行 30 分钟的中性液体中和后,在微菌落覆盖的生物膜底层图 pH 仍然低于 5.5。

致龋性多菌种生物膜中 pH 分布的另一特点是,在生物膜与培养液外环境相接的区域形成了高 pH 屏障区。生物膜内与微菌落相关的非均匀性分布。

四、多菌种生物膜对抗生素的反应

生物膜中的细菌生存状态与浮游菌相比是完全不同的,在显微镜下观察发现,其并不像浮游状态下的细菌那样处于分散状态,生物膜中的细菌趋向于形成微菌落形态,其外被多糖基质包被。多糖基质间的液体间隔中充满着细菌需要的养料、酶、氧及代谢产物。这些多糖

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

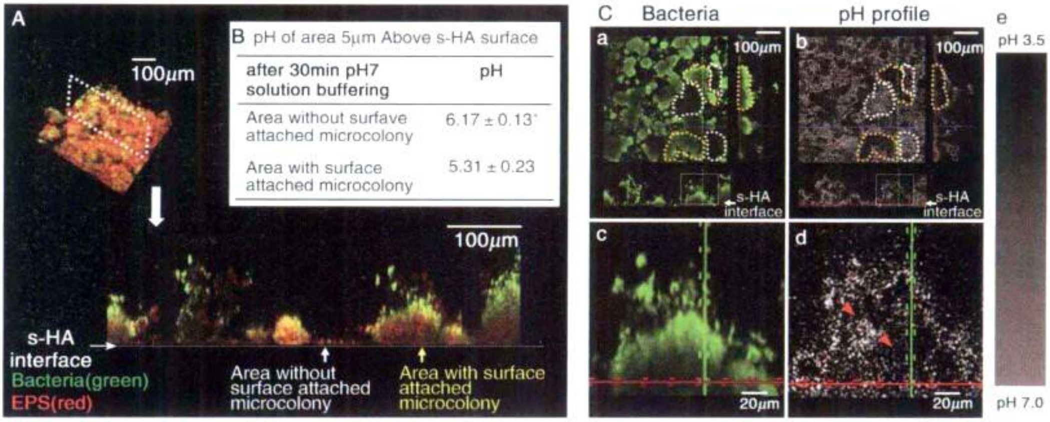


图 8-10　多菌种生物膜中胞外多糖-细菌微菌落 pH 值三维分布

注：A. 显示了从生物膜三维结构中截取一个纵向平面，下图用虚线框标出了选择性 pH 值测量区域，分别是包括和不包括胞外多糖-细菌微菌落的区域；B. 显示了包括和不包括胞外多糖-细菌微菌落的区域 pH 测量值，n=90；C. 在生物膜和羟磷灰石相接处的水平横切面细菌及 pH 原位成像图片。a、b 是横切面，黄色和白色虚线框表示了不包括和包括胞外多糖-细菌微菌落和区域；c、d 是放大的纵切面，红色箭头指示了由膜中胞外多糖-细菌微菌落引起的 pH 值三维分布；e 是可视化 pH 值坐标。此图修改自：Xiao J，Klein MI，Falsetta ML，et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLoSPathog，2012，8(4)：e1002623. Figure 5，6

基质同时起着对生物膜中细菌的保护作用，生物膜中细菌对抗菌药物具有更高的抵抗。研究发现，在比较高致龋性生物膜（1% 蔗糖）与低致龋性生物膜（0.1% 蔗糖）对抗生素（氯己定）的反应时，在高致龋性生物膜中，由于胞外多糖-细菌微菌落的存在，该结构使得细菌的存活率在 60 分钟氯己定攻击后仍能保持在 80% 左右；相反，在低致龋性生物膜，由于细菌缺乏有序结构（如胞外多糖）的保护，细菌存活率在 15 分钟攻击后就下降到 40% 左右（图 8-11）。

牙菌斑生物膜是多种细菌及胞外基质包裹的复杂生物体结构，其结构在生态变化中，如从生理向病理的转变中，也发生着相应的变化。在向致龋性生物膜的发展过程中，特异性结构胞外多糖-细菌微菌落的出现对生物膜中细菌种群分布、结构变化、pH 分布及生物膜对抗生素的抵抗能力都产生了明显的影响。在该转变中，与胞外多糖合成相关的基因（如 *gtfB* 和 *gtfC*）表达发生了时间相关性的增高，尤其是在多菌种生物膜形成的早期和中期。特异性结构胞外多糖-细菌微菌落维持了生物膜与载体附着表面的低 pH，也对耐酸细菌的自然选择创造了条件。胞外多糖对微菌落的覆盖及包裹影响了抗生素及抗生物膜药物的渗透，增强了生物膜的自我保护能力。

对生物膜微观结构的研究还有待进一步深入，同时，与生物膜生理-病理转变相关的特异性结构（胞外多糖-细菌微菌落）也将成为抗生物膜新药的攻击靶点，为抗生物膜的研究提供新的思路。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

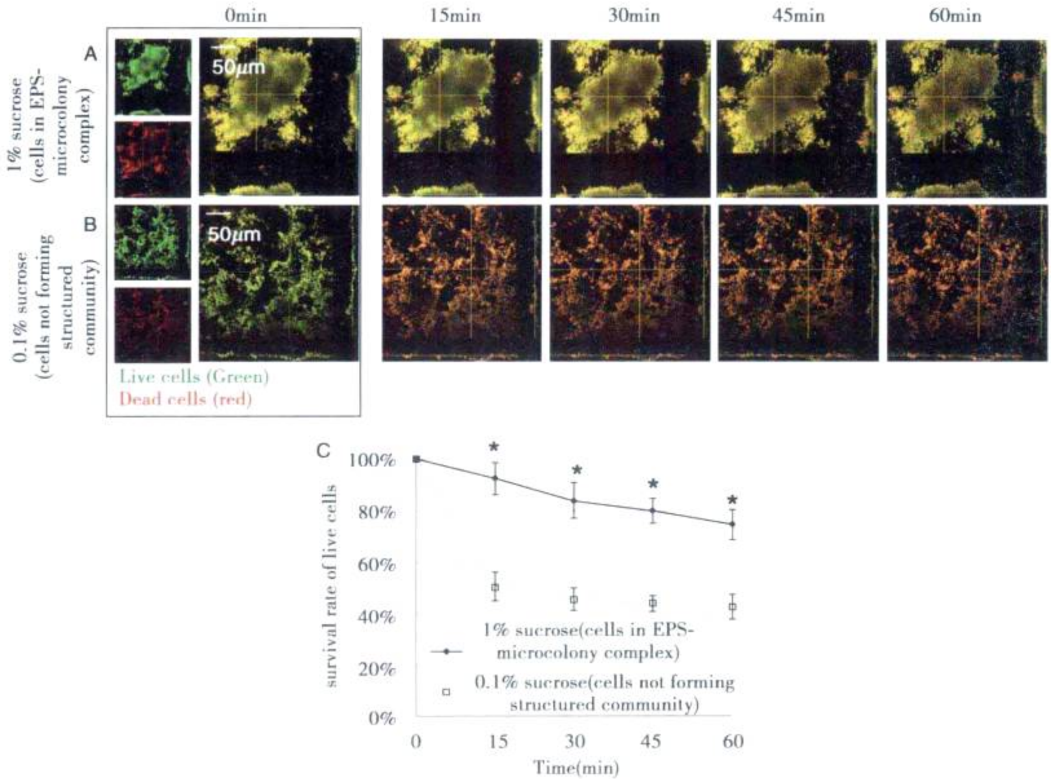


图 8-11　生物膜对抗生素抵抗的动态成像观察

注：左图（A）为胞外多糖-细菌微菌落中的细菌（形成于1%蔗糖），绿色是活菌，红色是死菌。图（B）是分散的细菌结构（形成于0.1%蔗糖）。该试验用0.2%的氯己定对生物膜进行抗生素攻击，并进行动态图像观察。图（C）显示的细菌的成活曲线，*表明有统计学差异，$P<0.05$（$n=6$）。此图修改自：Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLoSPathog, 2012, 8(4): e1002623. Figure 8

第五节　牙菌斑生物膜代谢对口腔生态境的影响

牙菌斑生物膜的代谢活动十分活跃，主要有微生物的物质代谢和菌斑内的矿物质转换。牙菌斑生物膜的物质代谢活动是在牙菌斑微生态系中进行的，与代谢有关的底物、代谢条件以及代谢产物，都将影响牙菌斑生物膜微生态系的生态环境，并最终决定牙菌斑生物膜的致病力。

一、牙菌斑生物膜的物质代谢

牙菌斑生物膜的物质代谢活动主要是由细菌产生的。这些细菌利用代谢底物不断地进行着新陈代谢。代谢的结果是利用含氮物质产生碱性物质升高环境中 pH，同时，通过转换碳水化合物产酸又降低环境中的 pH。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（一）糖的合成代谢

人们进食蔗糖或其他糖时，这些糖可进入菌斑，被细菌代谢。牙菌斑生物膜内的糖代谢包括分解代谢和合成代谢。糖的合成代谢的结果是形成细胞内外多糖，多糖的产生，特别是细胞外多糖，将直接影响牙菌斑生物膜生态系的结构，与致病性密切相关。

牙菌斑生物膜糖的合成代谢主要有细胞内和细胞外两个途径，当外源性糖丰富时，在菌细胞内，环境中的糖被转化为胞内多糖贮存于细胞内，主要有糖原和支链淀粉。在菌细胞外通过糖苷转移酶的作用，把一个糖分子从糖苷转移到另一个糖苷上，合成胞外多聚糖。牙菌斑生物膜中一些细菌产生的糖苷转移酶，如葡糖基转移酶（GTF）和果糖基转移酶（FTF），能将蔗糖裂解后产生的葡萄糖和果糖分别合成葡聚糖和果聚糖，有的合成杂聚糖。

（二）糖的分解

进入牙菌斑生物膜内的糖经水解成单糖，如葡萄糖和果糖，进入细胞内，在细菌体内进行着复杂的代谢。此代谢有许多中间过程，其中有一共同的中间产物是丙酮酸盐。丙酮酸盐形成后，依据环境中有无氧的存在，代谢可按不同的方式进行。

糖有氧氧化途径发生在牙菌斑生物膜的表层，为有氧分解代谢，丙酮酸盐完全氧化成 CO_2 和水，并产生大量能量。

$$C_6H_{12}O_5 \rightarrow 2CH_3COCOOH + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + DF(-688.000cal)$$

糖无氧酵解途径发生在牙菌斑生物膜的深层，由于氧不易进入，同时牙菌斑外层的需氧菌将氧耗尽而使牙菌斑生物膜深层处于缺氧状态，在牙菌斑生物膜的深层主要是无氧发酵，产生有机酸，这些酸包括乳酸、甲酸、醋酸、丙酸、丁酸及乙醇等。细菌种类不同，发酵的终末产物不一样。

（三）碱性物质代谢

碱性物质代谢活动也是牙菌斑生物膜代谢的一个重要方面。细菌利用环境中的代谢底物（如尿素、氨基酸等）产生碱性物质，对菌斑 pH 调节起重要作用。

尿素代谢牙菌斑生物膜中的尿素酶能将唾液中的尿素水解成 CO_2 和氨。由于尿素酶和尿素的大量存在，尿素的水解是牙菌斑生物膜提供碱性物质的主要途径。

氨基酸代谢牙菌斑生物膜氨基酸可被细菌利用，其分解代谢可以通过脱氨、转氨和脱羧作用等方式完成。①氨基酸的脱氨作用：主要经过非氧化脱氨，生成丙酮酸和氨，牙菌斑生物膜中多数厌氧菌和兼性厌氧菌的脱氨方式；②脱羧作用：产生胺和 CO_2，使菌斑 pH 上升；③转氨基作用：通过氨基和酮基的相互转换产生相应的氨基酸和 α 酮酸。这一途径既是氨基酸分解的重要方式，也是氨基酸合成的途径。

蛋白质代谢微生物利用蛋白质一般首先通过蛋白水解酶使蛋白质水解成胨、肽，最后被肽酶水解成氨基酸。微生物不同，蛋白质不同，催化蛋白降解的酶不同，降解产物均不相同。

二、牙菌斑生物膜矿物质转换

牙菌斑生物膜矿物质转换包括牙菌斑生物膜与釉质之间的矿物质转移和牙菌斑生物膜与唾液的矿物质转换，前者是牙菌斑生物膜内的矿物质转换的主要方式。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（一）牙菌斑生物膜与唾液间的矿物质交换

唾液是牙菌斑生物膜矿物质的主要来源。唾液中矿物质的浓度和扩散方式直接影响到牙菌斑生物膜的矿物质浓度。唾液和牙菌斑生物膜中离子形式的钙、磷、氟等矿物质可以相互转换，扩散方向取决于浓度梯度。扩散过程是可逆的，最终在唾液与牙菌斑生物膜间达到动态平衡。

（二）牙菌斑生物膜与釉质间的矿物质转换

牙体内钙、磷、氟以固体晶相的形式存在于羟磷灰石和氟磷灰石。在酸性环境下，羟磷灰石和氟磷灰石溶解，钙、磷、氟释放到牙菌斑生物膜基质中，为溶解相，使牙菌斑生物膜液相中的钙、磷、氟增加。在碱性环境中，溶解度减小，便沉淀出来，使牙菌斑生物膜液相中的钙、磷、氟就减少。随着 pH 的变化，磷酸盐的钙、磷比例也有变化。当菌斑 pH 降低时，羟磷灰石会变成钙磷比值低的盐。pH 改变决定的牙菌斑生物膜内矿物质的转换与釉质早期龋的形成以及釉质表面脱矿和再矿化。

三、代谢产物对口腔生态境的影响

牙菌斑生物膜的物质代谢活动将对牙菌斑微生态系的生态环境造成影响。这些影响主要表现在以下几个方面：

（一）物质代谢活动的影响

牙菌斑生物膜物质代谢是由一系列生化反应组成的，牙菌斑生物膜优势微生物不同，其代谢底物也不尽相同，这些底物包括碳水化合物、蛋白质、氨基酸、脂类、尿素、糖蛋白和细胞外多糖等。不同的生化反应，就有不同的酶系，不同的温度、氧还原电势、离子浓度等反应条件。与物质代谢活动有关的诸因素的不同，直接构成了牙菌斑生物膜生态环境的差异。

（二）细胞内外多糖的作用

糖合成代谢的结果是产生细胞内外多糖，细胞内多糖指糖原和支链淀粉；细胞外多糖包括水溶性和水不溶性两种。水不溶性多糖，主要指 α-1,3 糖苷链的葡聚糖，又称变聚糖，分子结构分支程度高，呈高度绞链结构，这种结构是其生态学作用的基础。多糖对生态环境的影响主要体现在以下几个方面：

1. 参与牙菌斑生物膜基质组成，促进细菌黏附、集聚，加速牙菌斑生物膜形成。细菌细胞表面有葡聚糖的受体，特异结合葡聚糖，聚集细菌。葡聚糖带负电荷，黏附获得性膜和牙齿表面，一端与牙面结合，另一端与细菌表面的葡聚糖受体结合，使细菌黏附到牙面上。葡聚糖在细菌与牙面、细菌与细菌之间架起了一座桥梁，明显地促进了细菌的集聚和细菌的黏附，加速了牙菌斑生物膜的形成。

2. 生物屏障作用，使牙菌斑生物膜内、外各种物质的出入受到限制。由于水不溶性葡聚糖高度的绞链结构，使一些大分子物质或带电荷的物质被阻止在菌斑外，而一些低分子糖类或不带电荷的简单分子容易渗入。同时，牙菌斑生物膜细菌代谢产物不容易扩散出，如有机酸。

3. 牙菌斑生物膜代谢的储能形式　当外源性糖缺乏时，水溶性多糖、糖原和支链淀粉

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

可降解成单糖,释放能量,维持牙菌斑生物膜代谢。

(三) 有机酸的作用

牙菌斑生物膜糖分解代谢中,与龋病发生密切相关的是无氧酵解。无氧酵解产生大量的有机酸,引起环境酸度改变,使菌斑 pH 降低。1944 年,Stephan 首先描述了进食糖后菌斑 pH 变化与时间的关系,采用微型锑电极测量了进食糖后原位菌斑 pH 变化,建立了吃糖前后菌斑 pH 变化的动态曲线,即 Stephan 曲线(图 8-12)。从曲线可以看出,静止状态下,菌斑 pH 稳定,吃糖后几分钟内菌斑 pH 迅速下降到最低水平,以后逐渐回升,1 小时左右恢复原状。

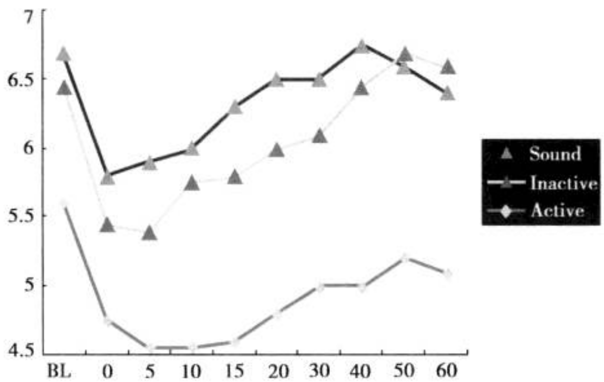


图 8-12　Stephan 曲线

菌斑 pH 的变化是食糖后牙菌斑生物膜中有机酸迅速产生、堆积和缓慢清除的过程。在牙菌斑生物膜深处,缺乏氧气,细菌能发酵糖,在短时间内产生大量有机酸,这些酸通过牙菌斑生物膜基质扩散相当缓慢,经相当长时间才扩散到外环境中,由于酸形成的速度快于向外扩散的速度,酸堆积于牙菌斑生物膜中使菌斑 pH 下降,当代谢底物耗尽,酸清除速度大于酸形成速度时菌斑 pH 回升。

牙菌斑生物膜内酸的清除可通过以下途径:①由牙菌斑生物膜扩散到唾液;②由牙菌斑生物膜代谢形成的碱性物质氨和唾液及牙菌斑生物膜的缓冲系统缓冲;③强酸转化为弱酸,韦永菌能将强的乳酸转化为弱的醋酸和丙酸。pH 与牙菌斑生物膜的糖代谢、氮源化合物的代谢密切相关,其酸性和碱性代谢活动在菌斑 pH 调节中起决定性作用。

Stephan 曲线使我们能全面地认识牙菌斑生物膜代谢活动对生态环境的影响,提示食糖后菌斑 pH 变化情况和下降最低点,不同个体的龋敏感性以及了解不同代谢底物的 pH 随时间的变化情况。

(四) 代谢底物的影响

牙菌斑生物膜内参与代谢的底物包括碳水化合物、蛋白质、脂类、氨基酸以及无机盐等成分。碳水化合物对牙菌斑生物膜微生态系代谢活动影响最大,对生态环境的影响也最大。当外源性糖丰富时,糖的合成及分解代谢加快,牙菌斑 pH 下降。糖的种类、物理性状和糖的浓度都与牙菌斑生物膜的代谢有着密切关系。混合致龋菌利用蔗糖、葡萄糖和果糖产酸类型相同,产生有乳酸、醋酸、甲酸、琥珀酸和微量丙酸。蔗糖和葡萄糖产生的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

有机酸总量无差异，果糖的产酸量明显低于蔗糖。利用果糖产生的琥珀酸高于蔗糖和葡萄糖。

蔗糖不仅使菌斑 pH 下降较多、较快外，还可作为细菌合成细胞外多糖的底物，而且细菌在含蔗糖的培养基中生长产生的 GTF 较多。

当外源性糖缺乏，氨基酸，如精氨酸等碱性氨基酸供给多时，牙菌斑生物膜碱性物质代谢加快，环境的 pH 上升。

第六节　牙菌斑生物膜生态平衡的调节

牙菌斑生物膜微生态系的生态平衡是指生态环境与微生物种群之间的平衡。生态平衡受多种生态因子的影响，各种生态因子相互作用调节牙菌斑生物膜的生态平衡。改变牙菌斑生物膜的生态因子将影响牙菌斑生物膜的致病性。

一、牙齿微环境

牙齿微环境是牙菌斑生物膜生态系主要的生态因子，是牙菌斑生物膜致病的具体环境。这些环境主要包括解剖情况不尽相同的牙齿邻面触点下方、牙面窝沟和光滑面等区域。因为各微环境的菌斑厚度、营养来源、氧化还原电势、离子强度及毒素成分的不同，决定了其微生物组成的差异。

牙齿表面各微环境细菌组成有明显的差异，窝沟内牙菌斑一般以革兰阳性球菌占优势，其次是革兰阳性杆菌，革兰阴性菌很少。光滑面牙菌斑生物膜中，放线菌较多，球菌较少；牙根面牙菌斑生物膜以放线菌为主。牙菌斑生物膜表层与深层的细菌也不同。表层需氧菌多，如奈瑟菌、奴卡菌；深层则厌氧菌多，如韦荣菌。

二、唾液微环境

唾液是一种天然冲洗液，正常的唾液分泌量平均每天约 1L，平均流速为 30ml/h。唾液能冲刷、稀释和清除停留在口腔、牙面上的细菌，使细菌成群落，抑制细菌黏附，利于细菌清除，是口腔微生态系重要的生态因子，在维持口腔生态平衡方面起主要作用。

唾液又是口腔微生物的培养基，牙菌斑生物膜细菌的营养来源之一。唾液含丰富的糖类、蛋白质、氨基酸、维生素等成分，有适宜的温度、湿度、pH、缓冲系、氧化还原电位，这些都有利于口腔细菌的生长。

（一）唾液蛋白质

唾液蛋白质是唾液重要的有机成分，主要包括糖蛋白、黏蛋白、免疫球蛋白。糖蛋白在牙面的选择性吸附是获得性膜形成的主要条件。获得性膜形成口腔微生物黏附和聚集的位点，为牙菌斑生物膜的形成奠定了物质基础。

分泌型 IgA（SIgA）是唾液中的主要免疫球蛋白，由血液通过腺细胞分泌进入唾液，在腺导管内，IgA 与涎腺导管上的分泌片结合，形成 IgA 的双聚体。SIgA 通过影响牙菌斑生物膜中各细菌之间的平衡调节牙菌斑生物膜生态系。其作用主要表现在阻止细菌黏附到牙面和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

黏膜表面,抑制牙菌斑生物膜形成;抑制细菌合成细胞外多糖的酶;抑制细菌糖酵解;抑制细菌生长或杀灭细菌。

乳铁蛋白是一种热稳定蛋白质,对大多数细菌有抑制作用。铁是细菌生长所需的基本元素。乳铁蛋白具有很强的螯合铁能力,每分子乳铁蛋白能连接二分子铁。乳铁蛋白通过摄取细胞中的铁,抑制细菌生长。

纤维连接蛋白是唾液中的免疫活性物质,能黏附到获得性膜上,干扰牙菌斑生物膜的形成。

(二) 唾液酶类

唾液中生有很多酶,主要有溶菌酶、乳过氧化物酶系等,它们均能调节牙菌斑的生态平衡。

溶菌酶是一种低分子量的碱性蛋白质,能水解细菌细胞壁的黏肽链。通过抑制、杀菌和溶解作用,阻止对溶菌酶敏感细菌在牙菌斑生物膜内作用,参与牙菌斑生物膜微生态调节。牙菌斑生物膜中溶菌酶含量是唾液的 15 倍,可杀伤 7 个血清型的变异链球菌,溶解一些口腔细菌,这种杀伤作用与酶的浓度和作用时间有关。乳过氧化物酶系统由乳过氧化物酶、硫氰酸盐(SCN^-)和 H_2O_2 三部分组成。其催化反应为:

$$H_2O_2\text{+SCN-乳过氧化物酶亚硫氰酸盐+}H_2O$$

亚硫氰酸盐是一种毒性产物,可以使细菌糖代谢所需酶失活,有效地中止糖代谢,干扰有机酸的产生。很少量的亚硫氰酸盐就可以完全抑制变异链球菌利用葡萄糖产酸。

乳过氧化物酶还可以阻止菌细胞受 H_2O_2 的破坏,该酶可以与细菌触酶竞争 H_2O_2,减弱 H_2O_2 对细菌的破坏作用。

(三) 唾液缓冲体系

口腔中含有大量的产酸细菌,唾液 pH 一般处于中性状态,重要原因是唾液中存在着各种缓冲体系。这些缓冲体系在牙菌斑生物膜微生态环境中通过调节菌斑 pH,影响牙菌斑生物膜的生态平衡。

重碳酸盐是唾液中最重要的缓冲物质,表达公式为:

$$pH=Pka+\log([HCO_3^-]/[H_2CO_3])$$

式中 Pka 表示弱酸在此缓冲系内电离常数的负对数。公式表明唾液 pH 取决于弱酸的电离常数 ka 和组成缓冲体系的两个组分的浓度比值。Pka 是常数,一般值为 0.1。

唾液中的磷酸盐也以相同的方式发挥缓冲作用。唾液中的少量氨和可被细菌利用的尿素,均可直接或间接地中和细菌代谢产生的酸性物质,使口腔环境中 pH 下降受到抑制。唾液蛋白质也具有一定缓冲能力。

三、微生物相互作用

微生物之间的相互作用影响着牙菌斑生物膜的生态平衡。一些微生物相互依存,一些微生物互为对抗,体现了牙菌斑生物膜生态系中微生物的共生和抗生关系。

(一) 共生作用

共生是指生物在有机联系的共生条件下,彼此都能获益。共生作用在牙菌斑生物膜中广泛存在,调节牙菌斑生物膜生态平衡。牙菌斑生物膜中兼性厌氧菌和需氧菌对氧的消耗

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

促进了专性厌氧菌生长;韦荣菌不利用碳水化合物作为碳源,却利用其他菌斑菌产生的有机酸,缓解牙菌斑生物膜内酸性环境,利于非耐酸菌生长。

变异链球菌和血链球菌生长对营养要求的区别在于前者需要对氨基苯甲酸作为生长因子。当这两种细菌混合培养时,血链球菌能提供对氨基苯甲酸,促进变异链球菌生长。棒状杆菌产生维生素 K 能促进产黑拟杆菌生长。变异链球菌与白假丝酵母菌混合培养时,增加牙菌斑生物膜的总量;乳杆菌、轻链球菌和奈瑟菌与变异链球菌混合培养则减少牙菌斑生物膜的总量。

（二）拮抗作用

拮抗作用指一种微生物可以产生不利于另一种微生物生存的代谢物质,使微生物的生长环境发生改变的现象。通过改变渗透压、氧和二氧化碳张力,或通过产生毒素等产物,干扰微生物的代谢活动,抑制微生物的生长繁殖。

过氧化氢(H_2O_2)是一种非特异性的抗菌物质,低浓度时可抑菌,高浓度能杀菌。牙菌斑生物膜中的 H_2O_2 是触酶阳性链球菌、乳杆菌在有氧条件下的代谢副产物。牙菌斑生物膜中一定浓度的 H_2O_2 能抑制细菌生长,影响牙菌斑生物膜的微生态平衡。血链球菌产生的 H_2O_2 能抑制乳杆菌和放线菌生长,竞争性抑制其他细菌,首先黏附到获得性膜。牙菌斑生物膜中唾液链球菌、轻型链球菌也能产生 H_2O_2,且能竞争性抑制变异链球菌生长。

细菌素是由具有染色体外基因的细菌合成的一种杀菌蛋白质。它通过抑制蛋白质合成,影响 DNA 代谢和能量代谢等作用杀伤细菌细胞,牙菌斑生物膜中既有产细菌素细菌,又有细菌素敏感菌。变异链球菌的各血清型都能合成细菌素,C 型变异链球菌产细菌素最多。变异链球菌合成的细菌素能拮抗血链球菌、黏性放线菌,使牙菌斑生物膜中变异链球菌增加,常伴有血链球菌的减少。

四、碳水化合物

碳水化合物是牙菌斑生物膜的主要代谢底物。细菌利用碳水化合物产生酸,酸的堆积部位就是牙菌斑生物膜中耐酸菌的生态优势区,碳水化合物的变化也可能破坏牙菌斑生物膜的生态平衡,影响生态组成。

蔗糖使牙菌斑生物膜中变异链球菌、乳杆菌、放线菌明显增加;麦芽糖能减少菌斑中变异链球菌,但其致龋力与蔗糖相同,糖还影响牙菌斑生物膜中血链球菌的血清型。葡萄糖组,牙菌斑生物膜中以能水解七叶苷、发酵棉子糖的血链球菌的菌株为主,蔗糖组的血链球菌以不水解七叶甙和发酵棉子糖的菌株为主。

木糖醇减少菌斑中变异链球菌,山梨醇和甘露醇混合时,增加变异链球菌。当葡萄糖作为碳源时,木糖醇和山梨醇能抑制变异链球菌的生长。如果以果糖作为碳源,就没有这种抑制效果。

五、氢离子浓度

pH 是衡量牙菌斑生物膜生态平衡的一个重要参数。pH 影响细菌酶的活性、细胞分裂和细菌的生长繁殖,同时 pH 的变化还要影响牙体硬组织的溶解性和钙、磷、氟等离子的转化。口腔可提供的相对恒定的 pH 范围是 5 ~ 8。牙菌斑生物膜微生态系 pH 变化较

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

大。牙菌斑生物膜内产酸菌产生有机酸，降低 pH，利于耐酸菌的生长。pH 4.5 以下，只有乳杆菌、酵母菌能生存；pH 5.0，放线菌和一些链球菌可以生长；pH 6.0～8.0，几乎所有细菌都能生长；pH 9.0，乳杆菌、奈瑟菌不能生长；pH 9.5，放线菌、韦荣菌、梭杆菌、酵母菌和一些链球菌可以生存，但数量较少。不同细菌对酸的耐受度反映了细菌对生态环境的适应。

能使牙体硬组织发生溶解的 pH 称为临界 pH，其值为 5.2～5.5。pH 低于临界值，釉质脱矿，钙、磷释放到牙菌斑生物膜微环境内。临界 pH 是决定牙菌斑生物膜与釉质界面上牙体硬组织脱矿和再矿化以及矿物盐转化的重要指标。老龄牙菌斑生物膜的细菌生长缓慢，产生的氨量大于合成氨基酸所需的量，氨的聚集可影响菌斑 pH。薄而疏松的牙菌斑生物膜，细菌的代谢产物可弥散出去，菌斑 pH 改变较小，在摄取较多蔗糖后，合成的细胞外多糖可使牙菌斑生物膜变得致密，菌细胞的代谢产物有机酸和氨聚集在牙菌斑生物膜基质中，特别是唾液不易冲刷到的隐蔽部位，使菌斑 pH 保持在一低或高的稳定状态，这样可引起牙菌斑生物膜菌群的相应改变，引起牙齿的病理变化。

六、氟化物

氟是一种有效的抗龋元素，它能增加釉质的抗龋力，抑制细菌作用，调节牙菌斑生物膜的生态平衡。

牙菌斑生物膜内氟通过抑制细菌代谢所需酶系，使细菌生长、代谢紊乱或停止；通过抑制细菌胞体大分子脂磷壁酸的合成，干扰细菌对牙面的黏附。氟能抑制细菌对葡萄糖的摄取，影响多糖的合成，抑制细菌产酸，干扰碳水化合物的代谢。

牙齿是牙菌斑生物膜微生态系主要的生态因子，氟通过影响釉质性质和结构来保护釉质。氟可以打断 Ca^{2+} 桥，解除蛋白质和细菌对釉质表面的吸附，降低釉质表面的自由能，起到保护釉质表面的作用。同时，氟离子通过与羟磷灰石反应形成氟磷灰石，降低釉质在弱酸中的溶解度，促进脱矿釉质的再矿化。

七、精氨酸对牙菌斑生物膜微生态系影响

口腔细菌产碱对牙菌斑生物膜微生态系有着重大的影响。碱可中和导致牙齿硬组织脱矿的有机酸，并可以防止出现致龋的口腔微生物菌群。Kleinberg 认为产酸-产碱细菌的比例变化是龋病发生的核心因素。因此，调节牙菌斑生物膜的产碱能力可能是防治龋病的非常有前景的方法。

（一）口腔细菌的产碱系统

pH 是一个重要的环境因素，其可影响定植在人口腔硬组织的口腔生物膜的生理、生态和致病性。口腔致病菌代谢碳水化合物产生有机酸受到很多关注。现在，证据逐渐显示产碱菌在维持口腔生物膜 pH 稳态起着重要作用，且可能缓解龋病的发生和发展。

口腔生物膜有复杂的营养物质来源，因此，有着复杂的产碱系统。在成熟的牙菌斑中有超过 600 种细菌，它们中的很多能够产生氨基酸脱氨酶（deaminases）和脱羧酶（decarboxylases），分别释放出 NH_3 和 CO_2。在牙周组织，牙龈卟啉单胞菌可代谢含谷氨酸盐和天冬氨酸盐残基的多肽以产生 NH_3、丁酸盐和丙酸盐，这些终产物具有细胞毒性，干扰宿主细胞的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

功能和免疫反应。与同型发酵的链球菌及乳酸球菌生活密切相关的韦荣球菌，能够分解低pKa的乳酸使环境pH升高。

口腔细菌产碱途径包括：尿素激酶（urease）水解尿素（urea），精氨酸脱亚胺酶系统（arginine deiminase system，ADS）水解精氨酸（arginine），胍基丁胺系统（agmatine deiminase system，AgDS）水解胍基丁胺（agmatine）和苹果酸乳酸发酵系统（malolactic fermentation，MLF）代谢L-苹果酸盐（L-malate）。

尿素和精氨酸是牙菌斑生物膜代谢产碱的两种重要底物，它们都可以经唾液腺分泌，两条途径都很高效，最终的产物也类似，为 NH_3 和 CO_2，不同的是精氨酸水解后还可以产生ATP。但是，精氨酸被认为更适合作为防龋药物，原因在于代谢精氨酸的细菌谱更合适而尿素的使用可能导致其他一些临床问题。

生物膜中的胍基丁胺是精氨酸经脱羧酶作用后形成的。AgDS与ADS高度类似，其产物是腐胺、NH_3、CO_2 和ATP。AgDS在很多细菌中存在，包括一些变异链球菌和表兄链球菌，AgDS的意义被认为仅增强某些致龋菌的耐酸和在低pH时的产酸能力。

L-苹果酸盐可以被苹果酸乳酸酶分解为L-乳酸盐和 CO_2。尽管该过程并不产生 NH_3，但被认为可以促进胞质碱化。

（二）ADS途径及其调节

细菌代谢精氨酸主要有4种途径，分别是精氨酸酶途径（arginase pathway）、精氨酸琥珀酰转移膜途径（arginine succinyltransferase pathway）、精氨酸转氨酶/氧化酶/脱氢酶途径（arginine transaminase/oxidase/dehydrogenase pathway）、精氨酸脱亚胺酶途径（arginine deiminase pathway，ADI或AD pathway），其中，AD途径是最广泛的精氨酸厌氧代谢途径，也是口腔细菌多应用的途径，其系统一般称为精氨酸脱亚胺酶系统（arginine deiminase system，ADS），该途径也被称为ADS途径。

AD途径是三步的酶反应过程，其主要途径为：

第一步：精氨酸 $\xrightarrow{\text{精氨酸脱亚胺酶(AD)}}$ 瓜氨酸+NH_3

第二步：瓜氨酸 $\xrightarrow{\text{鸟氨酸转氨甲酰酶(cOTC)}}$ 鸟氨酸+氨甲酸

第三步：氨甲酸 $\xrightarrow{\text{氨基甲酸酶(CK)}}$ NH_3+CO_2+ATP

其总反应式为：精氨酸$\longrightarrow 2NH_3+CO_2+ATP$

此反应净产物与尿素分解产碱类似，不同之处在于可产生ATP。

口腔含有丰富的精氨酸底物。唾液腺可分泌游离精氨酸，唾液腺管中精氨酸的平均浓度大约为50μmol/L。

唾液中的蛋白质和多肽含有丰富的精氨酸，比如，富组蛋白含有大约10%～20%的精氨酸。这些蛋白质和多肽可经蛋白酶和多肽酶水解释放出精氨酸，然后被细菌利用。牙菌斑中细菌的主要精氨酸来源是精氨酸多肽，其可被 ADS^+ 的口腔链球菌稳步地降解。有研究发现含精氨酸的多肽可能比游离状的精氨酸更早被细菌使用。

口腔软硬组织上定植的口腔菌群中，ADS^+ 细菌大量存在，主要为非变链的链球菌（non-mutans streptococci），包括血链球菌（*S. sanguis*）、戈氏链球菌（*S. gordonii*）、副血链球菌（*S. parasanguis*）、米氏链球菌（*S. Milleri*）、缓症链球菌（*S. mitis*）。变异链球菌群（mutans streptococci）一般不能代谢精氨酸产碱，但大鼠链球菌（*S. rattus*）除外。粪肠球菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(*Enterococcus faecalis*,曾称 *Streptococcus faecalis*)一般不定植在牙菌斑内,而与根管感染相关,但因其可代谢精氨酸产碱而常被研究。此外,一些放线菌如内氏放线菌(*Actinomyces naeslundi*)、龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*),一些乳酸菌如纤维二糖乳杆菌(*Lactobacillus cellobiosus*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)和发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)和螺旋体,也可代谢精氨酸产碱。

牙菌斑生物膜中细菌的 ADS 活性可以被多种环境因素调控,尽管调控的方法和机制在细菌之间有不同。诱导(促进)的因素包括精氨酸、低 pH,抑制因素包括碳分解产物抑制(糖代谢抑制)、氧气、氟化物、弱酸、膜活性剂、抗菌剂、锌和精氨酸类似物。对 ADS 抑制的机制包括:抑制基因转录表达、抑制膜对精氨酸的转运、抑制相关酶或蛋白和底物竞争抑制等。

1. 诱导(促进)因素　作为底物,精氨酸可以诱导 ADS 活化。一个被抑制的 ADS,去掉抑制因素后,加入精氨酸后,ADS 可迅速代谢产碱。

低 pH 有利于增强 ADS 系统。刘娅玲发现 pH(pH 5.0~5.9)可以增强戈氏链球菌的 ADS 基因表达。Takahashi 报道酸的预处理(pH 5.5)可以增强 ADS 的活性。血链球菌和大鼠链球菌的 ADS 活性并不会被低 pH(pH 4~6)明显的影响。值得提出的是,ADS 酶耐酸,在低于糖酵解最低 pH 一个单位情况下仍具有活性,这一 pH 低于生长 pH 两个单位。在低 pH 下能够进行精氨酸分解(arginolysis),使得 ADS^+ 细菌能够逆转致死性的酸环境。

一些细菌间的相互作用可以增加 ADS 的活性。比如将戈氏链球菌与内氏放线菌共同培养时,戈氏链球菌的 ADS 活性增加了,原因可能是精氨酸的生物合成和 ADS 的表达增强。

2. 抑制因素　对于大多数的链球菌,当碳水化合物底物充足时,为让细菌快速代谢碳水化合物,其他代谢途径相关的基因将会被抑制,即碳分解产物抑制(carbon catabolite repression,CCR)。其意义在于可允许它们优化能量产生。碳分解产物抑制对于链球菌具有重要的意义,而 ADS 在很多细菌中可被不同程度的碳分解产物抑制。这些细菌在糖(如葡萄糖)和精氨酸同时存在时,显示了经典的两阶段生长代谢:糖大量存在时 ADS 被抑制,几乎无 NH_3 产生,当糖被耗尽或即将耗尽时,细菌开始代谢精氨酸产碱。

不同的口腔链球菌,其 ADS 对于碳分解产物抑制的敏感性有不同。血链球菌可被葡萄糖明显地抑制 ADS 活性,其被完全激活的 ADS 活性为完全抑制的 1467 倍。戈氏链球菌也可被显著地抑制,而大鼠链球菌的被抑制效果不明显。一种耐高压变异的粪肠球菌甚至不被葡萄糖抑制。从糖的种类而言,蔗糖和葡萄糖可以抑制 ADS 而半乳糖不具备如此作用。

口腔链球菌的 ADS 可被氧气(或通气状态)所抑制,且此抑制效果对于血链球菌和戈氏链球菌明显而对于大鼠链球菌并不明显。氧气的抑制机制尚不明确,可能与一些对氧气敏感的调节蛋白相关,如 FNR 或 ANR。

在分子水平上,氟化物对 ADS 的相关酶的抑制作用并不强,仅在高浓度时(50mM)对鸟氨酸转氨甲酰酶(ornithine transcarbamylase,cOTC)作用。但是,在菌斑水平,氟化物在酸性条件下可以抑制链球菌的精氨酸分解过程。

pH 5 的情况下,0.5mM 的 NaF 可以减少血链球菌代谢精氨酸产碱能力的 50%,而在中

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

性情况下，这种抑制作用并不明显。二倍体精氨酸、三倍体精氨酸甚至大分子的含精氨酸多肽的代谢也同样可被 pH 5 的氟化物抑制，但中性情况下不明显。抑制的机制可能为对精氨酸摄取的减少或多肽的降解被氟化物的弱酸效应所抑制。

吲哚美辛可高效抑制浮游状态下及单菌种细胞膜状态下的血链球菌和大鼠链球菌，而癸酸及月桂酸（或月桂酸盐）的抑制作用稍弱。其作用靶点为精氨酸摄取转运系统及 ADS 相关酶。

羟苯甲酸酯类、对羟基苯甲酸衍生物等膜活性剂，经常被用于防腐剂，也可抑制精氨酸产碱。丁基苯甲酸在 2μmol/L 的浓度下即可完全抑制戈氏链球菌、大鼠链球菌和血链球菌利用精氨酸或含精氨酸多肽产 NH_3。机制也可归结为抑制精氨酸的经膜转运，同时，其也可以抑制 ADS 相关酶，但仅对通透细胞而非完整细胞。

三氯生对口腔链球菌具有广谱抗菌作用，对浮游状态及细胞膜状态的血链球菌、大鼠链球菌及牙菌斑代谢精氨酸产 NH_3 具有抑制作用，且该作用不受 pH 影响。其作用途径可影响细菌对精氨酸的摄取，也可作用于 ADS 相关酶，如氨基甲酸酶（carbamate kinase，CK）。

锌可抑制变异链球菌产酸，同时它也可以抑制大鼠链球菌代谢精氨酸产 NH_3，其机制可能为抑制 ADS 相关酶。

L-Canavanine 为精氨酸类似物，是精氨酸的 N-亚甲基被 N-O 取代后的产物。因此，它可竞争性地抑制精氨酸经精氨酸脱亚胺酶（Arginine deiminase，AD）水解为瓜氨酸和 NH_3 过程。

（三）ADS 对于口腔细菌的意义

1. 酸适应保护　一些口腔细菌并不具有高度耐酸的 ATP 酶，它们可通过 ADS 从唾液中获取底物产碱，从而改善局部的酸性状况。这对牙菌斑生态系具有重要的意义，使不耐酸细菌利用既有条件（唾液中含精氨酸多肽或游离精氨酸）在 pH 剧烈变化的牙菌斑生物膜中生存下来。

成熟菌斑 pH 可下降至 4.0，在进食糖类物质后常可检测到。有实验显示，碳水化合物代谢导致的低 pH 可使恒化器中混合菌群中的血链球菌数量明显减少。但是，在 pH4.0 的条件下，给予 ADS^+ 细菌一定量精氨酸，它们可在几小时内升高 pH 至中性，然后重新开始糖酵解。

酸处理（pH5.5）可促进精氨酸转换为瓜氨酸及 NH_3。另一个实验发现，在保持低于 pH 4.0的情况，ADS^+ 细菌可迅速被杀死，若加入精氨酸，它们可存活，然而，若直接加入 NH_3，该保护作用不能被检测。显然，NH_3 需要进入胞质才能发挥保护作用，它可以与一个质子结合产生无毒的 NH_4^+。CK 反应产生的 ATP 可以被质子排出 F-ATPase 酶水解，从而使酸破坏进一步的减弱。

2. 提供能量　AD 代谢途径可提供 ATP，因此，很多 ADS^+ 细菌可利用精氨酸作为唯一底物供能。ADS^+ 细菌经常可协同调节精氨酸的合成，使用鸟氨酸逆生成酶（ornithine antiporter），催化交换终产物变化底物，而这一过程没有净能消耗。

3. 厌氧生长　ADS 代谢途径不需要氧气参与，因此，可以提供能量的 ADS 允许一些细菌厌氧生长。

（四）精氨酸对多菌种牙菌斑生物膜影响

在 20 世纪 70～80 年代，Kleinberg 实验室进行了产碱细菌的研究。他们在体内使用锑电极重复并细化了 Stephan 曲线在不同个体、同一个体的不同牙位以及不同龋活跃程度个体

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

之间的表现,在体外使用唾液沉淀模拟体内牙菌斑酸-碱代谢,认为其主要的优点是可以源源不断地提供在口腔环境中生长并兼容的口腔混合细菌样品,没有必要在口腔外培养口腔分离株然后再在许多混合菌种实验重组它们,同时,pH 是可被用于混合细菌系统变化的指标。

利用精氨酸或者含精氨酸的小分子多肽产碱被认为是参与菌斑 pH 回升的非常重要的因素。引入葡萄糖和精氨酸作为底物后,在体外可重现 Stephan 曲线并可探讨其影响因素。底物糖浓度和唾液缓冲力对 pH 回升过程影响很大。

实验发现,在低浓度糖底物时(0.05% 或 0.1% 葡萄糖),有唾液上清液存在时,pH 下降达到最小值时,随后逐渐回升至基线;无唾液上清液存在时,初始的 pH 下降的最小值更低,并在很长一段实验期保持低水平。没有唾液上清液时,pH 下降加剧了,Stephan 曲线的上升部分消失了。pH 上升丢失的部分原因是没有了唾液重碳酸盐的存在。在高浓度的糖底物是(0.5% 葡萄糖)时,初始 pH 像之前一样下降,无论有无唾液,pH 均无上升,显示高浓度的发酵糖可以抑制 pH 回升。

ten Cate 实验室针对代谢精氨酸产 NH_3的影响因素也进行了研究,其中使用了一种封闭式的高通量附着式体外生物膜模型,在体外使用唾液接种,形成多菌种生物膜。这种多菌种生物膜可以弥补唾液沉淀实验观察期较短的不足。实验也证实了糖和低培养液缓冲力对 pH 回升及 NH_3产量的抑制作用。

糖酵解产酸和低缓冲力对环境的共同影响是低 pH。实验进一步的检测培养液低 pH 对产 NH_3的作用,随着 pH 从中性水平降低,NH_3形成量反而增加,仅当 pH 降至 4.5 以下时,其形成量显著下降。在含大量耐酸和产酸的菌群的生物膜中,消耗糖类后,其 pH 可降至较低水平,不利于 NH_3的形成和 pH 回升。在该种情况下,Stephan 曲线中的低 pH 状态将会持续较长状态,龋病将更容易发生。这一发现和推测的最终结论与广义生态菌斑假说一致。

Kleinberg 实验室将 ADS^+细菌和非 ADS^+细菌按照不同的比例混合,检测产生的相应 Stephan 曲线的特点。实验发现,当 ADS^+细菌比例较高时,有助于形成一个致龋性较小的 Stephan 曲线(pH 下降幅度较小,回升较容易);若比例相反,则形成一个致龋性较大的 Stephan 曲线。实验同时也发现,牙菌斑生物膜中的碱和酸能同时产生,它们会互相抵消,最终确定菌斑 pH。结果认为,碱产生缺陷是龋病发生中一个重要因素,与代谢发酵型的碳水化合物一样产生过量的酸一样重要。Kleinberg 及同事根据他们多年的实验,推演了一个新的理论,即龋病很大程度上源于保留的牙列上定植的微生物菌群成分的改变,这一改变导致了过多酸的产生和(或)产碱能力的缺陷。精氨酸可成为增强碱形成对抗龋病的制剂。

(五）精氨酸防龋的临床试验

相对于龋活跃个体,无龋个体牙菌斑中的静止 pH(resting pH)更高,其原因在于菌斑中有更多的 NH_3生成。进一步的,无龋个体唾液腺分泌的唾液中含有更高浓度的游离精氨酸。最近的研究显示,无龋个体唾液的菌群具有更高的 ADS 活性,儿童口腔精氨酸代谢和口腔健康有着正相关。随机临床实验显示含精氨酸的牙膏和薄荷糖具有潜在的防龋效果。

口腔健康与一些 ADS^+细菌(如血链球菌)正相关,龋病时它们的比例下降。但是,实时

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

荧光定量核酸扩增检测系统(real-time quantitative PCR detecting system,qPCR)显示无龋和有龋患者牙菌斑生物膜中的血链球菌和戈氏链球菌数量并没有显出差异(尽管他们唾液菌群的 ADS 活性有显著差异)。除去需要对所使用的 qPCR 方法再改进和使用其他检测方法验证这一结果外,这样的结果也可以有以下合理的理解:①可能存在其他 ADS^{+} 细菌比例的改变;②宿主口腔中的很多其他因素,如精氨酸底物水平、糖消耗量、唾液流量等,影响血链球菌或戈氏链球菌 ADS 活性,从而影响了龋状态;③同是血链球菌或戈氏链球菌,其固有的 ADS 活性也有显著差异,从而比例无差异,效果有差异。因此,临床研究需要根据龋病的发病特征和 ADS 系统的固有特点及调控因素继续探索。

细菌代谢精氨酸产碱对于控制龋病有两个重要的途径:一是直接增加菌斑 pH,从而调整脱矿-再矿化平衡;二是通过控制在低 pH 时有竞争优势的致龋菌的过度生长,有利于口腔健康相关细菌的持续生存,调节牙菌斑生物膜微生态系的平衡。

ADS 相关的产碱在原核生物中广泛存在,它对适应酸或无氧环境、提供营养、细菌毒力等具有重要作用。产碱需要很好的控制,因为环境的过度碱化是致命的,而 ADS 的过度活跃可耗尽生物合成所需的精氨酸。产碱是牙菌斑生态学中一个重要的因素,需要继续研究获得足够的信息,以能够操纵这个系统以控制疾病。

(周学东　施文元　肖谨　Hyun Koo　JM ten Cate　黄雪莲)

参 考 文 献

1. 周学东,施文元. 微生物生物膜与感染. 北京:人民卫生出版社,2011
2. 周学东,梁景平. 龋病学. 北京:人民卫生出版社,2012
3. 岳松龄. 现代龋病学. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993
4. Al-Ahmad A,Wunder A,Auschill TM,et al. The *In Vivo* Dynamics Of *Streptococcus Spp.*,*Actinomyces Naeslundii*,*Fusobacterium Nucleatum* And *Veillonella Spp.* In Dental Plaque Biofilm As Analysed By Five-Colour Multiplex Fluorescence *In Situ* Hybridization. J Med Microbiol,2007,56:681-687
5. Koo H,Xiao J,Klein MI,et al. Exopolysaccharides produced by Streptococcus mutansglucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. J Bacteriol,2010,192:3024-3032
6. Listgarten MA,Mayo HE,Tremblay R. Development Of Dental Plaque On Epoxy Resin Crowns In Man. A Light And Electron Microscopic Study. J Periodontol,1975,46:10-26
7. Mayer C,Moritz R,Kirschner C,et al. The role of intermolecular interactions:studies on model systems for bacterial biofilms. Int J Biol Macromol,1999,26:3-16
8. Overman PR. Biofilm:a new view of plaque. J Contemp Dent Pract,2000,1:18-29
9. Palmer RJ Jr,Gordon SM,Cisar JO,et al. Coaggregation-Mediated Interactions Of Streptococci And Actinomyces Detected In Initial Human Dental Plaque. J Bacteriol,2003,185:3400-3409
10. Kolenbrander PE. Oral Microbial Communities,USA:ASM Press,2011
11. Reese S,Guggenheim B. A Novel TEM Contrasting Technique For Extracellular Polysaccharides In *In Vitro* Biofilms. Microsc Res Tech,2007,70:816-822
12. Watnick P,Kolter R. Biofilm,city of microbes. J Bacteriol,2000,182:2675-2679
13. Wood SR,Kirkham J,Marsh PD,et al. Architecture Of Intact Natural Human Plaque Biofilms Studied By Confocal Laser Scanning Microscopy. J Dent Res,2000,79:21-27
14. Xiao J,Klein MI,Falsetta ML,et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLoS Pathog,2012,8:e1002623

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

15. Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. J Antimicrob Chemother, 2005, 56: 324-330
16. Zaura-Arite E, Van Marle J, Ten Cate JM. Conofocal Microscopy Study Of Undisturbed And Chlorhexidine-Treated Dental Biofilm. J Dent Res, 2001, 80: 1436-1440
17. Zijnge V, van Leeuwen MB, Degener JE, et al. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. PLoS One, 2010, 5: e9321

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第九章 儿童口腔微生态

儿童口腔微生态平衡或失调的影响因素同样来自于口腔微生物群、宿主与环境三方面，同样是三者相互作用的结果。口腔正常微生物群与宿主之间、正常微生物群之间，通过营养竞争、代谢产物的相互制约等因素，维持着良好的口腔生态平衡。在一定条件下，这种平衡关系被破坏，原来不致病的正常微生物群中的细菌即可成为致病菌。口腔正常微生物群随着人体不同发育阶段及生理功能的变化而有所不同，在婴幼儿、青少年、成人及老年存在着有规律的动态变化，这是与成人口腔微生物群动态变化不同的儿童口腔微生态的特点。

第一节　儿童口腔的特点

从新生儿、婴幼儿到青少年，口腔经历了哺乳期、断乳期、乳牙萌出期、乳恒牙替换期及完整恒牙列建立期，不同时期的口腔正常微生物群都有着不同的特点，比如在哺乳期的婴幼儿口腔存在着双歧杆菌数量及种属的变化，在乳牙萌出及乳恒牙替换时存在口腔链球菌的数量及种属的变化等。随宿主生理变化产生的微生物群落组成和数量上的规律变化称为口腔微生物的生理性演替（physiological succession）。

一、儿童口腔器官生长发育、生理功能的变化特点

生长发育是一个连续不断的发展过程，不同年龄的儿童各组织器官的发育程度不同，其生理解剖特点也不同。儿童的生长发育受遗传因素和环境因素的影响，基因是决定遗传的物质基础。儿童生长发育的特征、潜能和趋势，是由父母双方的遗传因素共同决定的。与遗传因素相关的代谢缺陷、内分泌障碍、染色体畸形等可严重影响儿童口腔器官的生长发育，比较明确的遗传性疾病有牙本质发育不全、先天缺牙或无牙症（anodontia）等。一些遗传性疾病除全身症状外，还会在口腔颌面部出现表征，如外胚叶发育不全综合征，患儿表现部分先天缺牙、锥形牙等一系列症状；儿童掌跖角化综合征可出现牙龈肿胀、牙周组织明显破坏，乳、恒牙均可出现早期松动、脱落等症状等。出生前母体的营养状况、全身或局部感染及出生后的家庭环境、经济状况均可影响儿童的生长发育。

（一）儿童口腔各器官的生长发育特点

儿童时期的口腔各器官与全身其他器官一样，处在不断的生长发育变化之中，最明显的是颅面骨骼和颌骨内牙发育。婴儿出生时，颅骨与面骨之比约 8∶1。随着颌骨的发育和牙萌出，面部快速增长，到成人时，颅、面比例约为 1∶1。颅骨的生长发育开始较早，其生长发

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

育曲线符合神经系统的生长发育曲线，颌骨的生长发育曲线基本符合体格生长曲线。

牙是咀嚼器官的重要组成部分，从胚胎第6周乳牙胚开始发生，到12～13岁完整的年轻恒牙列建立，整个牙发育过程持续14年左右；从出生时的无牙到婴儿0.5岁左右乳牙开始萌出之前为无牙阶段，婴儿口腔全为黏膜上皮覆盖；从第一颗乳牙萌出到3岁左右第二乳磨牙萌出称为乳牙列时期，开始出现不同于黏膜上皮表面的牙表面、龈沟等微生物生境（habitat）；从7岁左右第一颗新生恒牙开始萌出到全部乳牙脱落完毕称为混合牙列时期，在这一阶段口腔内既有乳牙也有恒牙，是儿童颌骨和牙弓的主要生长发育期。13岁左右第二恒磨牙完全萌出，建立完整的年轻恒牙列。随着儿童口腔组织器官的这些变化，其口腔微生态也发生着相应的改变。

（二）儿童口腔各个器官的生理功能变化

口腔是人类消化系统的起始器官，其前壁为唇，侧壁为颊，顶部为硬软腭，底部为口底黏膜和舌下腺等结构。舌的前2/3位于口腔，称为舌体；舌后1/3为舌根，构成咽前壁。舌为一肌性器官，具有感觉味觉、协助咀嚼和吞咽食物以及辅助发音的功能。舌背上遍布舌乳头，包括数目最多的丝状乳头、数目较少的菌状乳头、位于舌侧缘后部的叶状乳头及舌后部体积最大的轮廓乳头。在儿童口腔临床常可见低龄儿童舌背上出现不规则的丝状乳头萎缩，与正常黏膜分界清楚，且可不断改变部位的游走性舌炎，这是一种浅表性非感染性的舌部炎症，患儿一般无明显自觉症状，可有轻度瘙痒或对刺激性食物敏感，随年龄增大自行消失。

无牙期的婴幼儿以吸吮乳汁等为主要营养来源，为与之适应，处于这个时期的婴幼儿上下牙槽嵴部位有较厚实的龈垫，唇肌及咀嚼肌发育良好，颊脂垫丰满，这为其有力的吸吮动作提供了良好的条件。随着乳牙的萌出，颅颌面骨骼的发育，为满足婴幼儿日益增长的营养需求，其咀嚼功能开始增强，食物开始向多样化过渡，儿童口腔生境发生着规律性的变化。

唾液是口腔生态系的重要组成部分，其分泌和流动不但润湿口腔组织表面、维持着口腔生态环境的湿度和pH，还与口腔微生物的关系密切。唾液不仅为口腔微生物的黏附、增殖和定植提供必要条件，也可通过矿物质含量、各种离子浓度、氟化物含量、缓冲能力、氧化还原电势（Eh）、溶菌酶、乳铁蛋白、S-IgA、纤维结合素和维生素等变化调节着口腔微生物的种群和数量，影响着口腔微生态平衡。新生儿唾液腺发育不完善，分泌少，其食物主要为乳汁等流质食物。出生后3～4个月唾液分泌开始增加，第一颗乳牙（下颌乳中切牙）开始萌出时的5～6个月婴儿唾液分泌显著增强，由于口底浅，这时候的婴儿常发生生理性流涎，随着年龄的增长，流涎现象会自行改善。母乳喂养的新生儿及婴儿唾液中含有来源于母体的一些免疫球蛋白，这些被动来源的抗体对婴幼儿口腔中早期定植微生物起一定的作用。

在口腔生态环境中，唾液和黏膜表面具有较高的Eh，因此萌牙前的婴儿口腔Eh较高；随着乳牙的萌出，龈沟、相邻牙面及咬合面沟裂的出现，使口腔生态环境的Eh变低，并呈现不同生境及生态位点Eh的差异。不同的Eh给多种微生物提供了有利的生存环境，牙菌斑生物膜是口腔生态环境中一个重要的生态系，也是反映口腔微生物生态学特点的重要生态系。牙菌斑生物膜形成初期Eh较高，随着牙菌斑的不断发育、成熟，菌斑增厚，其Eh可降低，其中的微生物组成与数量也发生着改变。一般到年轻恒牙列建立时，儿童口腔中的微生态及微生物群组成几乎接近成年人口腔微生物群组成。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、口腔细菌定植特点

口腔生境中生态因子的变化是影响口腔正常微生物种类、数量和定植的重要因素。出生前的胎儿口腔在母亲子宫内通常是无菌的，出生后即暴露在与之接触的人和周围环境中，黏附是细菌定植的第一步。在新生儿口腔中，细菌首先定植于黏膜表面，在此基础上开始建立人口腔正常微生物群。

研究发现，在剖宫产的新生儿口腔中未检出细菌，从顺产的新生儿口腔中可分离到乳杆菌（*Lactobacilli spp.*）、表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、肠球菌（*Enterococci*）和粪链球菌（*Streptococcus facealis*）等，刚出生新生儿口腔的检出细菌可部分来源于其母亲产道、皮肤、周围环境及接生员皮肤。由于微生物定植生境的选择性，这些细菌难以在新生儿口腔长期定植，仅仅成为口腔的过路菌（transient flora）。新生儿口内微生物主要获得是在出生后的人的喂养和接触（餐具、食物），其他从空气、灰尘中也接触到细菌。出生 6～10 小时后的新生儿口腔微生物数量显著增加，出生及数天内其口腔微生物组成不稳定、种类的检出波动较大。

新生儿口腔微生物的特点是数量少，种类简单，以需氧菌和兼性厌氧菌为主。目前已分离出的新生儿口腔微生物包括链球菌属（*Streptococci*）、乳杆菌属（*Lactobacilli*）、奈瑟菌属（*Neisseria*）、韦荣菌属（*Veillonella*）、葡萄球菌属（*Staphylococci*）、大肠埃希菌属（*Coliforms*）及肠球菌（*Enterococci*）。草绿色链球菌（*Viridans streptococci*）又称甲型溶血性链球菌，是最早定植于新生儿口腔的微生物，并为其口腔优势菌，包括唾液链球菌（*S. salivarius*）、缓症链球菌（*S. mitis*）及口腔链球菌（*S. oralis*）。已发现新生儿出生后第一天即可检出 *S. salivarius*、*S. mitis* 和 *S. oralis*，这些甲型溶血性链球菌属于人类口腔的早期定植菌（early colonizer）。对其遗传学分析发现，这些菌株的基因型与新生儿母亲或其他家庭成员的口腔微生物基因型一致性显著，提示新生儿与其亲属间的密切接触是新生儿口腔正常微生物群的重要来源。

出生几周后，新生儿口腔微生物群的多样性显著上升，出生后 2～6 个月（乳牙萌出前）的婴儿口腔中即可检出具核梭杆菌（*Fusobacterium nucleatum*）、颊纤毛菌（*Leptotrichia spp.*）及溶牙放线菌（*Actinomyces odontolyticus*）；乳牙萌出前，口腔微生物只能定植于新生儿及婴儿口腔黏膜表面，黏膜上皮是一种随着代谢不断脱落的组织，无牙期新生儿口腔微生物的检出具有不稳定性。

乳牙的萌出为微生物的定植提供了不脱落的表面（non-shedding surface），增加了微生物相对稳定的定植生境，且出现了牙面、龈沟、咬合面点隙沟裂及相邻牙间隙不同的定植区域。乳牙的萌出使牙菌斑生物膜（dental biofilm）的形成成为可能，极大丰富了婴儿口腔微生物的组成和种类，二氧化碳噬纤维菌属（*Capnocytophaga spp.*）、侵蚀艾肯菌（*Eikenella corroden*）、梭杆菌属（*Fusobacteria spp.*）均可在其口腔中检出。血液链球菌（*Streptococcus sanguis*）、变异链球菌（*Streptococcus mutans*）、戈氏链球菌（*Streptococcus gordonii*）在婴幼儿口腔的定植依赖于乳牙萌出。

随着牙齿萌出，厌氧菌比例增加，如纤毛菌属、螺旋菌属、具核梭杆菌和弧菌等也增加。新生儿口腔中少有厌氧菌定植，韦荣菌属为最早在人类口腔中定植的厌氧微生物，在出生一周左右的新生儿口腔即可检测到。乳牙萌出前常能检出的厌氧菌为溶牙放线菌，随着乳牙的不断萌出，具核梭杆菌、放线菌属（*Actinomyces spp.*）及非产色素类普氏菌属（*Prevotella*

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

spp.）的检出逐渐增加。在1岁左右的婴幼儿口腔中，内氏放线菌（*A. naeslundii*）、黏性放线菌（*A. viscosus*）、杰瑞斯放线菌（*A. gerencseriae*）以及格瑞文提兹放线菌（*A. graevenitzii*）、新月形单胞菌属（*Selenomonas spp.*）、梭菌属（*Clostridium spp.*）以及一些牙周可疑致病菌如中间型普雷沃菌（*Prevotella intermedia*）、牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*）均可有检出。母亲唾液中产黑色素普氏菌和具核梭杆菌的数量与其孩子口腔中这两种菌的早期定植呈明显正相关，中间普氏菌却不存在这种相关关系。

假丝酵母菌（*Candida spp.*）在新生儿口腔中定植的高峰是出生后1个月左右，随着月龄的增大，检出率逐渐下降。假丝酵母菌在早产新生儿出生一周内其口腔中的数量是足月产新生儿的2倍，这种差异与新生儿的唾液流量与性质、新生儿的发育状况及其家庭经济状况有关；健康新生儿口腔中假丝酵母菌的检出率与婴儿的年龄、性别及喂养方式无关。

第二节　生长发育与口腔微生态的关系

生长发育是儿童时期的重要特点，表现出与年龄相关的规律性，临床上按年龄划分为胎儿期、新生儿期（出生~4周）、婴儿期（出生后5周~12个月）、幼儿期（1~6岁）、学龄期（6~12或13岁）和青春期（12或13~18岁）。由于不同发育时期口腔解剖结构的变化，唾液中各种蛋白等营养因素、抗菌因素的变化、饮食的变化等，儿童口腔微生态及口腔微生物群的组成和数量也随之变化。

根据口腔微生态环境变化特点，儿童时期分为无牙期、乳牙萌出期（stage of primary tooth eruption）、乳牙列期（stage of primary dentition）、混合牙列期（stage of mixed dentition）和年轻恒牙列期（stage of adolescent permanent dentition）。不同牙列时期，不同的饮食习惯、家庭环境、口腔卫生习惯及父母口腔微生物群落之间的差异均可导致不同的儿童个体之间的定植微生物种类和数量不同。了解不同时期儿童口腔微生态的特点将有利于建立维持口腔微生态平衡的条件，防治平衡失调引起的各种口腔感染性疾病的发生。

一、无牙期的口腔微生态特点

出生后第一天的新生儿口腔中即可检出唾液链球菌（*S. salivarius*）和缓症链球菌（*S. mitis*），随着月龄增加，这两种甲型溶血性链球菌的检出率和数量均明显增加，在乳牙萌出之前为婴儿的口腔优势菌。母乳喂养的婴儿口腔中表皮葡萄球菌的检出率明显高于人工喂养的婴儿，但该菌在母乳喂养和人工喂养的婴儿口腔中数量上均不占优势，推测可能与母乳喂养的婴儿经常接触母亲乳房而感染母亲皮肤常驻菌有关，属于婴儿口腔的过路菌而非定植菌。

新生儿期口腔微生物的特点是数量少、种类简单，微生物群以需氧菌和兼性厌氧菌为主。因新生儿及无牙婴儿口腔的Eh较高，较少有厌氧菌的定植，可能存在一些适合于厌氧菌生存的小生境，比如舌丝状乳头之间的区域。韦荣菌属（*Veillonella spp.*）和溶牙放线菌（*A. odontolyticus*）在无牙期婴儿口腔可有检出，韦荣菌是这一时期婴儿口腔检出最多，同时也是最早定植人类口腔的厌氧菌，溶牙放线菌是最早从人类口腔中检出的放线菌属。

白假丝酵母菌（*C. albicans*）在新生儿口腔中的定植高峰在出生后1个月左右，这也是临床上常见的婴幼儿“雪口”病的好发年龄，推测可能与这个时期婴儿来源于母体的被动免疫

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

功能逐渐消失和婴儿的唾液腺功能不完全有关，提示无牙期的婴儿应注意预防假丝酵母菌的感染。随着月龄的增加，婴儿的主动免疫功能逐渐建立，假丝酵母菌在婴儿口腔中的检出逐渐下降。

二、乳牙萌出期的口腔微生态特点

乳牙的萌出使口腔解剖结构发生了变化，从而改变了婴幼儿的口腔微生态环境，口腔滞留区增加，出现了牙面、龈沟、牙咬合面的点隙沟裂、相邻牙间等多个生态点（biotopes）和生态位（niches），给微生物提供了更多、更复杂的定植生境，口腔微生物的组成和数量明显增多。

对同一个体、同一个牙的不同部位，因解剖结构及物理条件不同，微生物的组成也不相同。光滑牙面属于口腔自洁区，氧化还原电势较高，也容易受到唾液清洁、食物摩擦、刷牙等口腔卫生措施的影响，因此在光滑牙面的微生物以需氧和兼性厌氧的球菌为优势菌；牙的相邻面和点隙沟裂由于清洁措施不易接近，部位隐蔽，黏附于其上的微生物受到的脱落力较小，氧化还原电势较低，有利于厌氧细菌的进一步定植和生长，专性厌氧的梭杆菌一般在乳牙萌出后即可分离到。

越来越多的研究表明，血链球菌在人类口腔的定植依赖于乳牙的萌出，随着乳牙萌出数目的增多，血链球菌在口腔微生物群中所占的比例逐渐增加；变异链球菌的定植同样依赖于乳牙的萌出，依赖于口腔滞留区的出现和增加。血链球菌在婴儿口腔早期定植的“感染窗口期（window of infectivity）”，即定植高峰期（colonization peak）为出生后 9 个月，变异链球菌定植的“感染窗口期”为出生后 19 ~ 31 个月。随着变异链球菌在婴幼儿口腔中的定植，血链球菌的水平开始下降。口腔中无变异链球菌检出的婴幼儿其唾液中的血链球菌水平明显高于口腔中有变异链球菌检出的婴幼儿，说明血链球菌在口腔中的早期定植影响着其后定植的变异链球菌水平及其在牙面上的黏附。

婴幼儿口腔微生物组成受食物种类的影响较大。高蔗糖食物可使婴幼儿口腔中的变形链球菌、乳杆菌、放线菌明显增加，高麦芽糖食物可减少菌斑中的变异链球菌。牙菌斑生物膜中血链球菌的血清型受到婴幼儿摄入的碳水化合物种类的影响，进食葡萄糖为主的饮食时，生物膜中能水解七叶甙和发酵棉子糖的菌株增加；当进食以蔗糖为主的饮食时，生物膜中不能水解七叶甙和发酵棉子糖的菌株增加。血链球菌、变异链球菌、放线菌和乳杆菌的定植和增加是乳牙萌出期幼儿口腔微生物菌群的特点。

三、乳牙列期的口腔微生态特点

3 岁左右幼儿口腔乳牙列建立，一直到新生恒牙萌出之前，口腔生态基本处于平衡的状态，口腔微生物的数量和组成基本稳定。幼儿因乳牙牙冠短小、唾液分泌较多、进食频率较高等原因，其口腔微生物以需氧菌和兼性厌氧菌为主，但受到全身健康状态、口腔卫生习惯、食物种类及家庭经济社会地位的影响。

乳牙列期的儿童口腔中仍然以 *S. mitis*、*S. oralis*、*S. salivarius* 为其唾液及口腔软组织表面的优势菌，牙面龈上菌斑中放线菌属的检出远远高于唾液及软组织表面，具核梭杆菌（*F. nucleatum*）因其可黏附于上皮细胞表面而在儿童舌背样本中有较高的检出。龋敏感儿童牙面牙菌斑生物膜中变异链球菌、*Scardovia wiggsiae* 的数量和所占牙菌斑生物膜微生物的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

比例明显高于无龋儿童,喜食甜食儿童牙面的牙菌斑生物膜的变异链球菌、乳杆菌、双歧杆菌和放线菌的检出率和数量均远远高于不喜欢甜食的儿童。在变异链球菌与儿童龋关系的研究中发现表兄链球菌(*S. sobrinus*)的产酸性与耐酸性均强于变异链球菌(*S. mutans*),与ECC(early childhood caries)的发生明显相关。

口腔微生物可代谢碳水化合物产酸,从而使牙面菌斑 pH 降低。研究表明,一个无龋的乳牙列儿童牙面菌斑的静止 pH 约为 7.2,一个患有重症早期儿童龋(severe early childhood caries,S-ECC)的患儿牙面菌斑的静止 pH 可低至 5.5。Robert Stephan 经典的 Stephan 曲线实验显示,一个龋敏感(caries-susceptible)儿童用葡萄糖溶液漱口后,菌斑 pH 可在 10 分钟内从 6.0 以上降到 5.0 以下,这种菌斑 pH 的变化将会改变牙菌斑生物膜微生态组成,一些耐酸的致龋菌数量将明显增加,如变异链球菌、乳杆菌等数量将明显上升。

乳牙列建立初期上下颌乳牙排列紧密,随着颅骨与上下颌骨的发育,儿童咀嚼功能的加强,4 岁左右以后的幼儿乳牙列逐渐出现生理间隙,乳磨牙咬合面的点隙沟裂被咀嚼磨耗,这些生理性变化将导致不易清洁的牙齿邻间和被磨耗的咬合面点隙沟裂成为容易清洁的区域,儿童口腔的 Eh 可上升,厌氧菌的检出下降,需氧菌和兼性厌氧菌的比例有一定升高。宿主这一类生理性变化对口腔微生态的影响通常是暂时的,随着新的生态平衡建立而重新达到稳定状态。

四、混合牙列期的口腔微生态特点

随着混合牙列期的到来,儿童的牙齿数目增多、牙面数增多及上下牙列出现的暂时性拥挤均可导致儿童口腔滞留区增多,氧化还原电势下降,厌氧菌检出又呈现上升趋势。

口腔不同部位的微生物群组成不同,软组织表面还是以各种链球菌为优势菌,牙齿光滑面以黏附性较强的需氧菌为主,牙齿邻面及点隙沟裂的部位变异链球菌、血链球菌、放线菌、韦荣菌等兼性厌氧菌和厌氧菌的检出率较高。一些牙周致病菌,如牙龈卟啉单胞菌、中间型普雷沃菌、具核梭杆菌、月形单胞菌甚至螺旋体、伴放线菌聚集杆菌开始在这个年龄的儿童口腔检出。

混合牙列期的无龋儿童口腔微生物以甲型溶血性链球菌、*Abiotrophia defective*、*Streptococcus parasanguinis*、韦荣菌等的检出率较高,龋活跃儿童以放线菌、变异链球菌和乳杆菌为主。牙齿排列整齐、咬合正常、口腔卫生习惯良好的儿童其口腔微生物群的组成多样性大于有咬合不正或牙齿排列不齐的儿童,而后者口腔中的兼性厌氧菌和厌氧菌的丰度(abundance)大于前者。一些有特殊口腔护理需要的儿童(children with special oral care health need)在混合牙列时期由于监护人的口腔健康知识缺乏或自身语言、行为方面的障碍可能出现萌出性龈炎、牙面菌斑堆积的现象,而这一时期的暂时性牙列拥挤也可能导致口腔中一些牙周致病菌,如牙龈卟啉单胞菌、中间型普雷沃菌或螺旋体的检出增加。Umeda 对平均年龄 8.3 岁的混合牙列期儿童口腔菌群分析表明 8.9% 的健康儿童口腔可检出牙龈卟啉单胞菌,42.9% 可检出福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*),48.2% 可检出齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*),这些对营养及氧气敏感的牙周致病菌在健康儿童口腔的检出被认为是暂时的,要到年轻恒牙列时期后才呈比较稳定的检出。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

五、年轻恒牙列期的口腔微生态特点

由于乳牙的完全脱落、年轻恒牙列建立，这一时期的青少年口腔解剖结构已处于相对稳定的状态，免疫防御系统功能的逐步成熟，其口腔微生物处于一个相对稳定和持续的峰顶群落期。

年轻恒牙列时期唾液中微生物的数量可以从乳牙列时期的 10^9 ~ 10^{11}CFU/L 升高到 10^{13} ~ 10^{16}CFU/L，厌氧菌的大量定植和数量增加是青少年口腔菌群的主要特点，口腔内普雷沃菌、梭杆菌、卟啉单胞菌、二氧化碳嗜纤维菌、消化链球菌（*Peptostreptococcus*）、优杆菌（*Eubacterium*）均为常被检出的厌氧菌。青春期牙龈炎（puberty gingivitis）的高发病率除了与全身激素水平改变有关外，还与这些厌氧菌的增加密切相关。但在这一时期的唾液微生物中，梭杆菌、变形杆菌（*Proteobacteria*）、类杆菌（*Bacteroidetes*）和螺旋体的数量及检出率仍然低于成熟恒牙列期的唾液微生物数量。

随着儿童年龄的增加，儿童口腔微生态环境从乳牙萌出期、乳牙列期、混合牙列期到年轻恒牙列期，口腔微生物群种类逐渐增多，普雷沃菌属、韦荣菌属、假丝酵母菌和螺旋体的检出逐渐增加。在健康儿童口腔微生物群中链球菌属（*S. salivarius*、*S. mitis*、*S. oralis* 等）占了较大的比例，Crielaard（2011）研究发现 *Nessieria flavescens* 和 *Porphyromonas catoniae*（*P. catoniae*）在儿童口腔较多的检出可作为其健康状态的生物标记物（biomarker），*P. catoniae* 是近来研究报道的一种儿童口腔的早期定植菌，在乳牙萌出期即可有稳定的检出。遗传学分析表明，儿童口腔微生物的基因型与其父母亲及兄弟姐妹口腔微生物的基因型密切相关，他们之间的口腔微生物具有较高的同源性，显示个体之间口腔微生物的传播既可有垂直传播也可有水平传播的方式。龋病、牙周病、黏膜病等儿童口腔的病理改变，儿童免疫功能的逐渐成熟以及青少年时期激素水平的改变均影响着其微生物群落的组成及微生物各种属的丰度。

第三节　儿童口腔疾病与口腔微生态的关系

一、儿童龋病与口腔微生态

龋病是牙齿在外界因素影响下，釉质、牙本质或牙骨质发生的一种进行性破坏的疾病，其本质为细菌性感染性疾病。儿童龋病对儿童口腔局部和机体都有影响，也会影响咀嚼功能，导致口腔卫生恶化，乳牙龋发展成为根尖周炎症后，还会影响后继恒牙牙胚。同时，龋病还会影响颌面部和全身的生长发育，并可能成为病灶牙导致其他系统性疾病。龋病是一种多因素疾病，是宿主、微生物、饮食和时间 4 种因素相互作用才可能发生。而对于其他疾病危险因素的相关研究中还显示，性别、年龄、种族、家族遗传、经济基础等因素对龋病发生均有一定的影响。

乳牙龋患病率高，在 7 岁左右达到高峰。此后乳恒牙替换，患龋率下降。以往对我国儿童龋病调查的结果显示，5 岁儿童患龋率为 66%，乳牙龋均为 3.5，12 岁儿童患龋率在 40%，龋均为 1.03。

细菌的存在是龋病发生的先决条件。以往对口腔微生态的研究发现，口腔链球菌在龋

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

病儿童中发现率及含量均较高，被认为是主要致龋菌。相关的动物实验也表明，它能诱发动物产生龋病。除此之外，某些唾液链球菌、黏性放线菌、发酵乳杆菌和唾液乳杆菌、血链球菌也能诱导大鼠产生龋病，这些微生物的共同特点是均能产酸降低环境 pH 值并且在酸性环境中生存。

随着人们对口腔微生态的进一步深入了解及焦磷酸测序等高通量测序技术的应用，发现口腔微生物的种类远远超过人们预先的估计，以往的研究仅在口腔中发现 700 余种细菌，而在一项对 3～6 岁儿童口腔唾液及菌斑的微生态的研究则表明平均每个儿童口腔估计有 1600 种以上细菌。而这其中至少有 1/2 以上的细菌是不可培养菌，常规的实验技术手段会在一定程度上限制致龋细菌的发现。因此，使用新的细菌鉴定技术手段，对口腔微生态进行分析，发现了更多新的潜在致龋菌，包括双歧杆菌、放线菌属等。

儿童口腔微生态会随着年龄的改变、与外界环境的接触、家庭经济条件及口腔卫生习惯等多种因素而不断变化，致龋菌的种类也随着年龄阶段的不同而略有不同。

在乳牙列时期，乳牙牙体组织矿化程度低，容易脱钙，龋蚀进展快，多呈急性龋、湿性龋。且由于乳牙牙颈部出生后釉质矿化程度较低，龋易向两侧扩展，而不易向矿化程度高的、耐酸性强的出生前釉质扩展，以致多呈环状缺损。此时期口腔内菌群中变异链球菌属（特别是 *S. mitis*、*S. oralis*、*S. salivarius*）、韦荣菌属、奈瑟菌属、普氏菌属含量较高，为优势菌属。与成人或老年人的口腔菌群相比，儿童口腔中变异链球菌、不动杆菌属的含量较高。这与儿童的饮食习惯（进食次数较多、喜食甜食等）、生活环境、家庭经济基础等有一定的关系。

作者研究利用 PCR-DGGE 与 454 高通量焦磷酸测序方法相结合，对患有龋病儿童和无龋病儿童口腔菌斑和唾液的微生物菌群进行多样性的比较分析。发现有龋儿童口腔微生态多样性明显下降，龈上菌斑中链球菌属、韦荣球菌属、放线菌属、颗粒链菌属、纤毛菌属和硫单胞菌属以及表兄链球菌、中间链球菌、阴道乳杆菌、发酵乳杆菌、加氏乳杆菌、龋齿放射菌、衣氏放射菌、棒状杆菌属 *colne AK* 153、*Granulicatella elegans*、*Veillonella sp. HOT*-780 等含量较高，这些细菌相互作用，逐渐破坏生态平衡，最终导致龋病的发生。此外，严重龋坏儿童口腔中同时存在变异链球菌和 *Scardovia wiggsiae* 的共同检出率为 80%，高于变异链球菌或 *Scardovia wiggsiae* 任意一种的检出率，可能变异链球菌的存在并不是龋病发生的必要条件，龋病的发生是在多种细菌的共同作用下完成的，各种细菌之间在龋病的发展过程中存在一定的互助关系。

韦荣菌属与变异链球菌共存可以产生更多的酸且产酸量要高于变异链球菌，加速龋坏。对乳牙龋病的进展过程中，无龋牙面、白斑及深龋各个阶段菌斑细菌进行检测，发现除了变异链球菌含量增高外，放线杆菌、双歧杆菌、发酵乳杆菌、血链球菌、副血链球菌等含量都有所升高，且在龋病不同阶段，微生态又略有区别，放线菌属在白斑中含量较高，双歧杆菌、发酵乳杆菌等则在龋坏牙本质处多见。

除了这些与口腔龋病发生有关的细菌外，还有大量的维持口腔微生态或者说是与致龋菌相抗衡的有益菌被发现，对 3～5 岁有龋、无龋儿童龈上菌斑的分析中发现，轻唾链球菌属、弯曲杆菌属仅在健康儿童中出现，二氧化碳嗜纤维菌和普雷沃菌则在龋病组中含量下降，且链球菌属中血链球菌、缓症链球菌和口腔链球菌在健康组中出现频率较高。表明这些细菌有可能是与口腔微生态息息健康相关。对 3 岁严重龋坏儿童治疗 6～12 个月后口腔菌群的分析发现，严重龋坏儿童进行治疗后未再发生新龋坏时，变异链球菌、缓症链球菌属、纤

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

细弯曲菌、简明弯曲菌、二氧化碳嗜纤维菌、月形单胞菌属含量下降，而丙酸丙酸杆菌、奇异劳特罗普氏菌和二氧化碳嗜纤维菌检出率升高，丙酸丙酸杆菌、奇异劳特罗普氏菌和二氧化碳嗜纤维菌可能是维持口腔健康的有益菌群。

混合牙列时期口腔内厌氧菌如普雷沃菌、梭杆菌、卟啉单胞菌、二氧化碳嗜纤维菌、消化链球菌（*Peptostreptococcus*）、优杆菌（*Eubacterium*）常被检出。变异链球菌的含量比乳牙列期有所下降，而与成人相比，韦荣菌属、普雷沃菌属的含量逐渐上升，卟啉单胞菌、肉杆菌属的含量逐渐下降，莫拉菌属的含量几乎为0%。此时，随着恒牙的萌出，口腔微生物群种类逐渐增多，多样性较乳牙更为复杂，且多种牙周病原菌逐渐在口腔中定植。

年轻恒牙列时期，韦荣菌属、普雷沃菌属的含量较混合牙列时期有所上升，变异链球菌的含量稍有下降，但仍为口腔优势菌属。此阶段口腔菌群更趋于复杂化，更多的细菌参与到维持口腔微生态健康中来，Aas 在乳牙标本中发现 15 种与健康相关的细菌，年轻恒牙标本中则发现有 30 种，其中有 13 种与乳牙标本中的相同。

此阶段可能的致龋菌包括：变异链球菌、颊纤毛菌、具核梭杆菌、干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）、韦荣菌的部分种类和发酵乳杆菌，部分细菌与乳牙龋发展过程中相同，如变异链球菌、发酵乳杆菌（*Lactobacillus fermentum*）、*S. parasanguinis* 等，在乳牙龋中也被发现，但是又有所区别。合理的解释是恒牙口腔微生态较乳牙更为复杂多样，导致致龋过程更为复杂。

二、牙髓及根尖周炎与口腔微生态

乳牙患龋率居高不下。作为龋病的并发症，乳牙的根尖周炎作为龋齿的并发症亦为儿童牙科临床的常见病，是引起乳牙疼痛脱落的主要疾病。新生儿在出生 6～10 小时细菌开始在口腔出现并有菌群定植，细菌是引起根尖周炎的主要因素已得到肯定。

（一）儿童细菌感染牙髓根尖周组织的途径

1. 经由牙体组织　是儿童牙髓根尖周炎最常见的感染途径。通常发生于龋病、外伤性牙折、楔状缺损、畸形中央尖折断或磨损、畸形舌侧窝或知侧沟及牙隐形所引起的牙髓组织暴露或覆盖牙髓的牙配制很薄时。牙本质厚度<0.2mm 时，牙髓中就可发现细菌。根管内的细菌及代谢产物可通过根尖孔或侧支根管到达根尖周组织，继而引起根尖周病变。

2. 经由牙周组织　通过根尖孔，侧支根管进入牙髓所引起的牙髓炎称为逆行性牙髓炎，儿童很少见。

3. 血源感染及引菌作用　当牙髓发生代谢障碍或受创伤时，暂时的菌血症可引起细菌在牙髓中定植增殖，这种作用称引菌作用，极少见。

（二）儿童牙髓及根尖周炎的主要致病菌

口腔环境庇护了大量的不同种类的细菌菌丛，牙菌斑生物膜组成了这个复杂生态系统的大部分，能在常规环境变化时保持自身的相对稳定。当这个平衡被打破时则可致龋病，进一步可导致牙髓病等。

20 世纪 70 年代以来，随着厌氧技术的不断发展和应用，越来越多的研究发现，厌氧菌是感染根管的优势菌，在根尖周炎的发生、发展中起着重要作用，其中专性厌氧菌占绝对优势。Brook I 等从 12 例儿童急性根尖周脓肿中共分离到 59 株细菌，仅 6 株为需氧菌，厌氧菌分别为类杆菌、消化链球菌、消化球菌、梭菌属及放线菌。史洋等采集 26 例急性、慢性乳牙根尖

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

周炎患儿根管内细菌，急性乳牙根尖周炎组根管内共检出厌氧菌 63 株，分布于 5 个属，分布率由高到低依次为：消化链球菌(38%)、拟杆菌(29.5%)、梭杆菌(14%)、韦荣菌(7%)和真细菌(5.6%)；慢性根尖周炎组共检出厌氧菌 118 株，分布于 7 个属，分布率由高到低依次为：消化链球菌(40%)、韦荣菌(16.2%)、类杆菌(15.5%)、真细菌(7.0%)、丙酸杆菌(5.4%)、放线菌(3.9%)和梭杆菌(3.8%)。

乳牙感染根管检出的细菌以厌氧菌混合感染为主，需氧菌单独感染以及单一厌氧菌感染偶有存在。韦丽华报道在 50 例儿童乳牙根尖周炎感染根管中检出 2 例需氧菌单独感染(铜绿假单胞菌和白假丝酵母菌)及 1 例单厌氧菌感染。

Ruviére 研究 55 例年轻恒牙感染根管伴不可逆性牙髓炎和 51 例感染根管伴牙髓坏死或根尖周炎症，在牙髓坏死和患有根尖周病的根管中可检测出大量的厌氧菌种，主要是链球菌属、梭杆菌属、普雷沃菌属、卟啉单胞菌属、消化链球菌属、乳杆菌属，不可逆性牙髓炎中检测出的细菌种类较少。

（三）细菌引起儿童牙髓根尖周病的机制

细菌致病的物质基础

(1) 内毒素：感染根管及根尖周病变中的优势菌多为革兰阴性菌，如卟啉单胞菌、普氏菌、梭形杆菌和类杆菌等，胞壁中含有内毒素。牙髓卟啉单胞菌的内毒素可以诱导人牙髓细胞产生大量的 IL-1、13 和 IL-6。两者对炎症细胞有趋化作用，IL-1 还可刺激破骨细胞的形成。因此，内毒素在牙髓、根尖周组织的炎症反应中起着重要作用。

(2) 酶：根管内厌氧菌可释放多种酶，如透明质酸酶、胶原酶、硫酸软骨素酶、DNA 酶、RNA 酶、蛋白酶、纤维蛋白溶解酶等，与组织的破坏和感染有着密切的联系。

(3) 菌毛与荚膜：细菌的菌毛有利于细菌对宿主的附着，这是发挥其致病作用的重要条件。研究证实，放线菌、产黑色素厌氧杆菌等都有菌毛。细菌的荚膜也是重要的毒力因子，其在厌氧菌的自身防卫和宿主组织破坏中起着重要作用。如果将有荚膜的厌氧杆菌接种于小白鼠，可造成其脓肿。

(4) 细菌分解及代谢产物：细菌生长过程中释放的代谢产物，如氨、硫化氢、吲哚和有机酸等，能直接毒害细胞，导致组织损伤。牙髓卟啉单胞菌产生的丁酸可以抑制各种培养的人细胞生长，有机酸对组织细胞的毒性。

(5) 免疫反应：牙髓根尖周病的发生发展转化，都是细菌性感染和宿主抗感染两方面斗争的结果，细菌除了通过直接作用破坏机体组织外，主要还作为具有免疫活性的抗原诱使抗体发生免疫反应。机体的免疫系统参与了牙髓组织对外来有害物质的防御反应。

（四）牙髓根尖周炎临床症状和细菌的关系

对炎症牙髓、感染根管、根尖周病变组织的优势菌的研究表明，不同的病变类型，其细菌的种类和组成比例有所不同。研究表明，乳牙感染根管中，牙髓拟杆菌在部分有急性症状的病例组中检出，而产黑色素拟杆菌可能是造成乳牙根尖周炎严重松动叩痛的原因，与肿胀和根尖透影无关。

三、儿童牙周炎与口腔微生态

牙齿萌出，从无牙列到牙列完整是口腔结构变化最重要的一个环境因素，随着牙的萌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

出，牙龈、牙周膜、牙骨质和牙槽骨组成了口腔重要的生态区之一——牙周组织。新生儿的口腔中只有黏膜组织可供微生物黏附和定植，早期定植的细菌主要以需氧菌或兼性厌氧菌为主。

唾液链球菌是最早在口腔中定居的链球菌，一般在出生后1～2天就可以从新生儿口腔分离到，出生后几天口腔中的早期菌群包括葡萄球菌属、某些口腔链球菌属的种，还有奈瑟球菌属、乳杆菌属。3个月后，每个婴儿的口腔内均含有相当稳定的口腔细菌菌丛。无牙的婴儿不具备厌氧条件，除少数人能在扁桃体隐窝内找到厌氧菌外，口腔内无厌氧菌。当牙齿萌出后，出现了适合厌氧菌生长的环境，厌氧菌的种类增加。

（一）儿童牙周流行病学调查

国内外流行病学调查结果均显示牙周疾病在儿童有很高的发生率，但由于对儿童时期口腔疾病的预防主要偏重于龋病的防治，所以目前关于儿童时期牙周疾病的研究仍然较少，对儿童牙周疾病的认识尚显不足。Stamm等研究指出，从儿童期开始，牙龈即可出现不同程度的炎症，并且随年龄的增长有增加趋势。

第三次全国口腔健康流行病学抽样调查显示，牙龈炎在儿童和青少年中较普遍，患病率70%～90%，最早可见于3～5岁儿童，随着年龄增长其患病率和严重性也逐渐增加，青春期达到高峰，几乎所有儿童都有或轻或重的牙龈炎，青春期后牙龈炎的患病率随年龄增长而缓慢下降。混合牙列期随乳牙脱落及恒牙的逐渐萌出，牙周组织出现萌出性龈炎、探诊出血等问题。

与成人相比较，儿童时期具有更为复杂的口腔环境。牙周致病菌的感染、定植与临床症状之间存在相关性，研究发现在探诊出血阳性位点，同一部位同时检出3种（Pg、Aa、Bf、Pi）以上牙周致病菌的比例（33.3%）高于探诊后出血阴性位点（19.6%）。对那些同部位检测出3种以上牙周致病菌，已经患有探诊后出血阳性部位，或者PD≥4mm的儿童，则可认为是牙周病的高危人群，有必要对其进行进一步详细牙周检查及病情监测。

错𬌗畸形矫正也是青少年儿童口腔面临较常见的一个问题。青少年儿童随着各型错𬌗畸形的出现，接受正畸矫治的数量增长，牙周疾病发生率增加。由于戴用固定矫治器不利于口腔卫生的维护，同时也妨碍了口腔的生理自洁作用，唾液在局部的冲洗、调节能力减弱，致使局部菌斑、食物碎屑、软垢堆积，形成有利于细菌繁殖生长的条件，引起口腔内环境（特别是龈沟内）细菌组成的改变进而导致牙龈组织的炎性反应。矫治前，龈沟细菌主要以球菌和直杆菌为优势菌，球菌的比例较高，梭状菌、丝状菌、弯曲菌、螺旋体的检出率很低。戴入矫治器后一个月、2个月后球菌的比例下降，梭状菌和螺旋体的比例升高，戴矫治器3个月后球菌、梭状菌和螺旋体的比例逐渐接近正常，但与矫治前相比，仍有差异。

（二）青少年牙周炎

青少年牙周炎也称局限性侵袭性牙周炎，是指牙周病变局限于切牙和第一恒磨牙，至少有2颗恒牙有邻面附着丧失，其中一颗是第一磨牙，非第一磨牙和切牙不超过2个。在11～20岁的青少年中，其发病率约为0.12%～0.47%，发病原因虽未完全明了，特定微生物的感染及机体的防御能力缺陷为引起本病的主要因素。

伴放线杆菌被认为是侵袭性牙周炎的主要致病菌。首先在侵袭性牙周炎患者龈下菌斑

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

中可分离出此菌，而在健康对照组中含量较低。其次伴放线杆菌可对牙周组织产生破坏作用，产生白细胞毒素，杀伤白细胞使其产生溶酶体，破坏牙周组织，同时可抑制中性多形核白细胞的趋化。分泌的内毒素、胶原酶等都可破坏牙周组织及骨胶原纤维。还有其他的细菌也被发现在龈下菌斑中，并显示与疾病相关，如变黑普氏菌、中间普雷沃菌、牙龈卟啉单胞菌、福赛类杆菌，齿垢密螺旋体、纤细弯曲菌等在青少年牙周炎患者中的含量较高。有研究发现，青少年牙周炎患者中以月形单胞菌属为主，却未能检测出伴放线杆菌。这可能与牙周袋的深度有关，深牙周袋改变了微生态环境，使一些严格厌氧菌成为优势菌，伴放线杆菌不占主导地位。

四、儿童常见口腔黏膜病与口腔微生态

急性假膜性念珠性口炎在新生儿最为多见，发生率高达4%。此病多在出生后2～8天内发生，此病是由于机体免疫功能下降引起白假丝酵母菌感染，形成斑片状假膜性损害。白假丝酵母菌是此病的病原菌，在新生儿口腔中定植的高峰为出生后1个月，并且随着月龄的增大，其检出率逐渐下降。

手足口病是由于柯萨奇A16型病毒或肠道型71引起的。多见于3岁以下儿童。

原发性疱疹性口炎是由于Ⅰ型单纯疱疹病毒感染引起的口腔疾病，以6岁以下的儿童的较为多见，尤以6个月～2岁更多，因为婴儿出生后，体内含有抗单纯疱疹病毒抗体，抗体在4～6个月后消失，最易感染单纯疱疹病毒。

（邹静　陈晖）

参考文献

1. Papaioannou W, Gizani S, Haffajee AD, et al. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. Oral Microbiol Immunol, 2009, 24: 183-189
2. Soncini JA, Kanasi E, Lu SC, et al. Oral microbiota of children in a school-based dental clinic. Anaerobe, 2010, 16: 278-282
3. Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, et al. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. BMC Medical Genomic, 2011, 4: 22-35
4. Tanner AC, Kent RL Jr, Holgerson PL, et al. Microbiota of severe early childhood caries before and after Therapy. J Dent Res, 2011, 90: 1298-1305
5. Ling Z, Kong J, Jia P, et al. Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing. Microb Ecol, 2010, 60: 677-690
6. Lima KC, Coelho LT, Pinheiro IV, et al. Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. Caries Res, 2011, 45: 21-30
7. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol, 2008, 46: 1407-1417
8. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. J Clin Microbiol, 2010, 48: 4121-4128
9. Kanasi E, Johansson I, Lu SC, et al. Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. J Dent Res, 2010, 89: 378-383

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

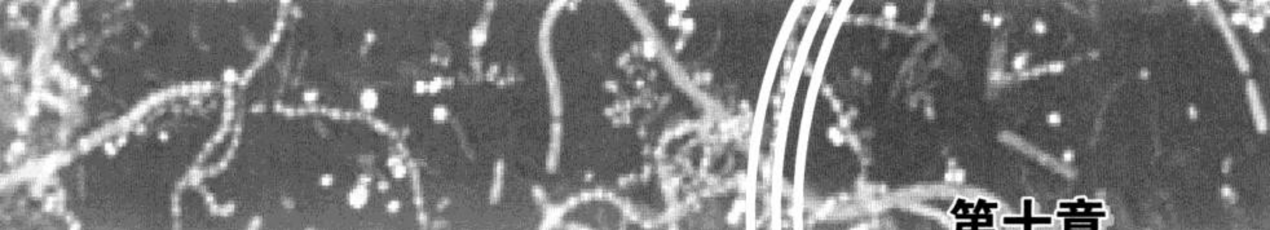
10. Tanner AC, Mathney JM, Kent RL, et al. Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. J Clin Microbiol, 2011, 49: 1464-1474

11. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, et al. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol, 2009, 36: 739-749

12. López R, Dahlén G, Retamales C, et al. Clustering of subgingival microbial species in adolescents with periodontitis. Eur J Oral Sci, 2011, 119: 141-150

13. Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? J Clin Periodontol, 2011, 38: 7-16

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



第十章

龋病微生态

龋病是牙面上的微生物群落——口腔生物膜，通常为牙菌斑生物膜中的细菌代谢糖类产酸的结果。微生物群落存在于牙面是龋病发生的先决条件。生物膜覆盖牙面并不会必然导致龋病。可以说，微生物生物膜的存在是龋病发生的必要而非充分条件，其他条件也可能参与其中。近年来，微生物学家在生物膜研究方面的进展揭示了细菌在牙面的行为特点及其与龋病的相关性。本章主要讲述龋病相关牙面微生态系统的构成、特点及其与龋病发生发展的关系。

第一节　牙齿的微生态区

口腔是消化道的最上部，牙齿作为口腔中最重要的器官，承担着咀嚼、发音、美观等重要功能，其结构较为复杂。牙齿的不同部位具有不同的结构特点，适宜于不同种类的微生物定植，形成了不同的微生态区。不同定植区微生物的功能被称为生境(ecological niche)，牙面的不同部位存在不同的生态位，在环境因素和代谢活动上具有相异的特点。

一、光滑面微生态境

光滑面包括牙的唇(颊)面和舌(腭)面。光滑面釉质的解剖外形，决定了只有那些对釉质有高亲和力的微生物才能在此部位定居。微生物学研究表明，在光滑面釉质表面，微生物组成复杂。相对于邻面，光滑面更易与口腔环境中的各种因素(如食物、唾液)接触，自洁作用较好，附着于光滑面的微生物更易于被机械清除，因此其生化构成和微生物结构与口腔其他部位具有一定差异。

光滑面菌斑中钙、有机磷及无机磷、镁、氟和糖类浓度均高于邻面，而脂类总浓度则仅为邻面的1/2。由于光滑面能与食物和唾液良好接触，食物中的成分既能快速进入光滑面菌斑，也有利于唾液发挥缓冲作用，所以进食糖类后5分钟，光滑面菌斑pH值降低的幅度明显大于邻面，但30分钟之内便会显著回升，2小时后光滑面菌斑pH值则明显高于邻面。因此，相对于邻面，光滑面釉质发生脱矿进而产生龋损的概率相对较小(图10-1)。

二、邻面微生态境

邻面包括牙的近中面和远中面。研究显示，邻面牙菌斑几乎所有的生化成分都低于光

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

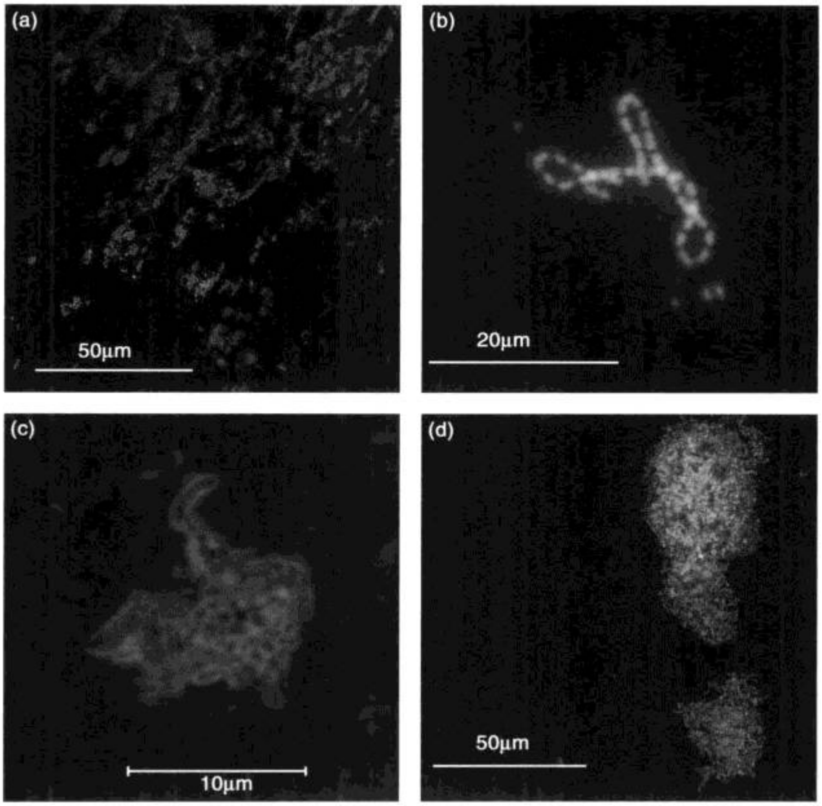


图 10-1　光滑牙面微生物群落

注:图片来源:C Hannig,M Follo,et al. 2010

滑面,但脂类总浓度高于光滑面。由于邻面的解剖特点决定了其唾液清除率较低,食物更易滞留,因此进食糖类后邻面菌斑 pH 值降低后的回升显著低于光滑面菌斑。在微生物组成方面,邻面与光滑面类似。

三、点隙窝沟微生态境

牙齿的点隙窝沟处,为细菌提供了很好的栖息场所。与釉质光滑面相比,其微生物组成种类相对简单。大多数研究点隙窝沟微生物组成的实验都使用探针或挖器从点隙窝沟开口处取得样本,但这种方法无法获得点隙窝沟深处的微生物。有的研究使用人工点隙窝沟模型,但这种方法不能完全反映天然点隙窝沟的复杂解剖特点和生物学特性。Fejerskov 等使用原位模型在该方向做出了新的探索,点隙窝沟微生态区的微生物群主要由革兰阳性球菌和短杆菌组成,也含有少量的革兰阴性球菌、杆菌、酵母菌。在牙菌斑生物膜形成的早期阶段,乳杆菌和变异链球菌的含量很低,随着时间推移,革兰阳性球菌和杆菌仍然是优势菌群,但优势菌种的分布在个体间差异很大,变异链球菌在总链球菌中所占比例则逐渐增大。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

四、牙齿根面微生态境

牙根面的牙骨质和牙本质相对于釉质含有更多有机物。牙根面与釉质光滑面一样，微生物种类较多。从健康牙齿根面可分离出以放线菌属为优势菌群的革兰阳性菌，链球菌属、双歧杆菌属、棒状杆菌属、乳杆菌属、消化链球菌属和丙酸杆菌属细菌亦有检出；革兰阴性菌则以普雷沃菌属为优势菌。也可检出弯曲杆菌属、二氧化碳噬纤维菌属、梭杆菌属、纤毛菌属、新月形单胞菌属细菌。

第二节 龋病的生态学说

一、特异性病因学说

大约一个世纪以前，W. D. Miller 通过一系列实验认识到口腔细菌在龋病发生中的作用。Miller 提出了化学细菌学说（chemico-parasitic theory），指出龋病的发生需要具有两个条件，即“酸的作用和细菌的作用”。然而，Miller 并没有意识到生物膜在致病过程中的关键作用，而是认为细菌主要存在于唾液中。受细菌学发展和研究手段的局限，Miller 未能分离出引起龋病的细菌，他认为口腔内所有产酸和溶解蛋白的细菌都可引起龋病，即龋病是由非特异性细菌引起的。。

二、非特异性病因学说

20 世纪 40 年代末，随着抗生素的发展，一系列动物实验为龋病病因提供了新的证据。Keyes 等使用啮齿类动物进行研究发现，无菌动物不会发生龋病，当接种了特定细菌后，龋病才会发生，并且可以在动物之间传播；同时，另一部分实验也证实了食物中可发酵糖在龋病发生中的关键作用。不同的细菌具有不同的致龋性，致龋性最强的细菌是变异链球菌组细菌，特别是变异链球菌和表兄链球菌，这一类细菌被视作龋病的病原菌，龋病被认为是一种特异性感染性疾病，该学说则被称为特异性病因学说。

三、生态病因学说

特异性病因学说的局限性在于，作为其理论基础的一列动物实验都是在高度人为化的条件下进行的，大多数实验动物仅仅被接种了一种细菌，与真实口腔环境具有很大差异。真实口腔中具有种类众多的细菌，细菌之间存在相互作用。龋病并不具备特异性感染性疾病的经典特征——Koch 原则，即：

1. 在所有的疾病个体中均能检出该微生物，但不能在健康个体中找到。
2. 该微生物可被分离并在培养基中进行培养，并记录各项特征。
3. 纯培养的微生物应该接种至健康个体，并产生与疾病个体相同的病征。
4. 从接种的个体上以相同的分离方法应能再分离出该微生物，且其特征与由原疾病个体分离者应完全相同。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

研究者认识到变异链球菌与龋病发病的关系并不绝对。Nyvad 和 Marsh 等发现，即使变异链球菌比例较高也不一定会发生龋病，反之亦然。变异链球菌可能并非龋病发生的始动因子，而仅仅反映了牙菌斑生物膜的生态失衡。龋病的生态病因学说逐渐为越来越多的学者所接受。

生态病因学说(ecological plaque hypothesis)认为，作为消化道的最上段，口腔定植着超过600种细菌，是人体最复杂也是最密集的微生物生态系统之一。过去被认为是龋病致病菌的变异链球菌在龋病初始阶段并不总是占菌群中的多数，随着病程发展，数量逐渐增加，提示变异链球菌并非龋病的始动因子，而是因为适应疾病状态下的微环境而逐渐成为优势菌，并进一步促进了病损的发展。一种可能的解释是，人类口腔的正常细菌(及普遍认为的非致病菌或共生菌)可以通过代谢等生理活动导致微环境发生改变，使其更利于具有更强致龋性的细菌(如变异链球菌等)生存。微生物组成和微环境动力学的变化增加了微生态系统的致病性。

生态病因学说认为龋病过程包含3个可逆的阶段(图10-2)：

1. 动态平衡阶段　健康釉质表面牙菌斑中生物膜的许多微生物都能代谢糖类产酸，导致牙体硬组织脱矿。如果酸化脱矿程度轻微且频率较低，牙菌斑生物膜中的缓冲能力和自我平衡能力可以恢复矿物质平衡，促进脱矿牙面再矿化。这样的动力学环境使微生物群处于平衡阶段，以非变异链球菌群和放线菌属细菌为优势菌。对于进食及饮食习惯健康的个

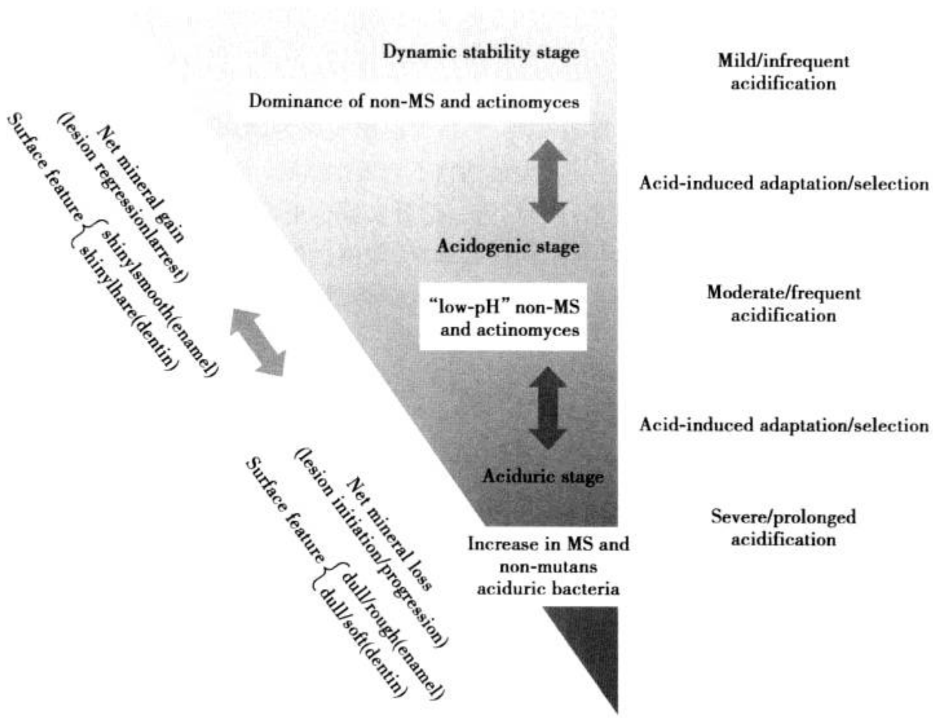


图10-2　生态病因学说的龋病发展阶段示意图

注：图片来源：Takahashi and Nyvad，2011

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

体而言，除了进食时外，口腔中的糖供给很少，故酸化程度轻微且频率较低。非变异链球菌群链球菌和放线菌属细菌均可利用唾液中持续供给的糖蛋白和氨基酸代谢产能，支持其在口腔这一营养供给随进餐而波动的环境中生存。

2. 产酸阶段　当糖类摄入频率增加或唾液分泌量少不足以中和产生的酸时，菌斑中的pH值降低变得稍强且频繁。这一改变可能促进了非变异链球菌细菌的产酸与耐酸的适应性变化，并使得更多的耐酸菌株如除变异链球菌外的其他“低pH”链球菌发生环境选择性增多。血链球菌、口腔链球菌、革氏链球菌和缓症链球菌处于酸性环境中时，其产酸能力将增强。

增加糖类摄入频率和唾液分泌量不足引起的酸化可成为促使非变链菌群链球菌产酸耐酸转化的驱动力，结果是牙菌斑生物膜微环境的酸性化和菌群产酸能力的增加。随着时间推移，这些变化可能导致脱矿-再矿化平衡向矿物质丢失的方向移动，引起龋病的发生及进展。

3. 耐酸阶段　虽然非变链菌群链球菌可以通过增加耐酸性和产酸能力，但长时间处于明显的酸性环境下，在酸性选择下（如酸损伤和酸抑制）耐酸菌更具竞争性。除了一些耐酸性极强的菌株外，非变链菌群链球菌和放线菌属细菌逐渐被耐酸性更强的细菌（如变异链球菌和乳杆菌属细菌）代替。在这一阶段，变异链球菌、乳杆菌属和其他耐酸链球菌、放线菌属、双歧杆菌属和念珠菌属细菌可能成为优势菌。很多产酸菌和耐酸菌都与龋病相关，而环境的酸化则是龋病过程中微生物群变现型和基因型的最主要决定因素。

第三节　龋病微生态

一、不同部位龋病的微生态特点

（一）光滑面龋

由于光滑面釉质的解剖外形，决定了只有那些对釉质有高亲和力的微生物才能在此部位定居。微生物学研究表明，在光滑面釉质表面，微生物组成复杂。在龋病发生期间微生物的组成比例不断发生变化，一些细菌数量增加，而另一些细菌减少。随着龋病的发生，变异链球菌和乳杆菌的变化显著。

在光滑面釉质龋损中都可以发现变异链球菌和乳杆菌。从早期光滑面釉质龋，即白垩斑采集的菌斑标本中，变异链球菌的比例明显高于邻近健康牙面，而乳杆菌未被检出，仅从邻牙健康牙面采集的少数标本中检出。变异链球菌与早期光滑面釉质龋的关系较乳杆菌更密切。变异链球菌与早期光滑面釉质龋具有阳性关系，但仅占光滑面菌斑细菌总数的2%～7%。

光滑面龋的一种特殊形式——婴儿奶瓶龋（nursing caries）病损的发生也与变异链球菌和乳杆菌密切相关，病损部位这两种细菌的比例明显增加。这可能是婴儿哺乳期间，这些部位经常与奶接触，使变异链球菌和乳杆菌数目增加。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

唾液链球菌也存在于光滑面釉质龋中，其数量随时间变化较大，随着菌斑成熟，唾液链球菌数目逐渐减少。与健康牙面相比，唾液链球菌数目无明显增加。

（二）邻面龋

邻面龋损处的微生物组成与光滑面龋类似，以变异链球菌的高检出率为特征。放线菌也存在于邻面龋损中，仅有少数报道认为溶牙放线菌与乳磨牙早期邻面龋有关。研究发现，儿童早期邻面龋中，变异链球菌和黏性放线菌的检出率增加，而韦荣球菌的检出率显著下降。

（三）点隙窝沟龋

点隙窝沟是龋病最好发的部位，该部位菌斑变异链球菌水平与龋病的相关性最高。在点隙窝沟龋处，变异链球菌和乳杆菌的数量较无龋点隙窝沟高，血液链球菌则相反，在窝沟龋处较正常窝沟少。一项经典的横断面研究发现，71%的点隙窝沟龋微生物样本中，变异链球菌计数占可培养微生物的10%以上，而70%的无龋点隙窝沟则无法检出变异链球菌。一项窝沟龋的纵向研究中，发生龋病时，该部位的变异链球菌比例显著增加。

（四）根面龋

在很长一段时间内，放线菌属细菌被认为是根面龋的特异性病原菌。这是因为相对于龋损部位表面，从较深部软化牙本质进行细菌分离与选择性培养结果显示该部位具有较多的革兰阳性多形性杆菌，这可能是放线菌素细菌对脱矿牙根组织选择性侵入的结果。最新的分子生物学研究证实了根面龋损牙本质菌群中具有大量的放线菌属细菌。仅有1/2的根面龋中能检出变异链球菌，且在菌群中所占比例很小。

普遍认为，根面龋起始于根面菌斑细菌的产酸脱矿，在其过程中，细菌对蛋白质的降解也具有重要作用，因为牙根面的牙骨质及牙本质含有较多有机物，如胶原蛋白。根面龋的临床表现与组织病理与釉质龋是不同的，一些特定的微生物与根面龋相关。

根面从健康状态向龋病状态转化的过程中，细菌多样性逐渐降低。在根面龋中，不仅有产酸菌和耐酸菌，也有具有溶蛋白和溶肽活性的细菌参与。根面龋中有革兰阴性菌、噬细胞菌和二氧化碳噬纤维菌的存在，它们的移动能力使它们容易侵入牙本质小管，促进病损的进展。

从根面龋损中可分离出大量革兰阳性菌，其中常见的有放线菌、血液链球菌、轻链球菌、肠球菌、双歧杆菌、罗氏菌、乳杆菌、丙酸杆菌等，也可分离到少量革兰阴性菌如韦荣球菌等，还可分离到念珠菌属细菌。几乎从所有根面龋损中都能分离到黏性放线菌，其数量可高达培养细菌的45%。变异链球菌和乳杆菌分离率高的根面后来发生根面龋的机会较大，黏性放线菌和内氏放线菌则相反。根面龋表面菌斑的优势菌属为非变链菌群链球菌和放线菌属细菌，放线菌属细菌优势菌株则根据其耐酸性差异而有所不同，从龋损根面分离菌株的耐酸性要强于从临床健康根面分离的菌株，提示产酸或耐酸放线菌属细菌（即低pH放线菌属细菌）与根面龋的相关性。

早期根面龋（未形成龋洞）的微生物构成与健康根面类似，但内氏放线菌和包括中间普雷沃菌和二氧化碳噬纤维菌属细菌在内的革兰阴性菌数量稍有增加。这些细菌的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

增加可能在根面龋的发展中具有重要作用,因为根龋的进展不仅有细菌产酸导致的组织脱矿,还有细菌蛋白溶解作用对胶原基质产生的降解。在静止根面龋中,革兰阴性细菌相对较少。

二、不同进展速度龋病的微生态特点

(一) 慢性龋

一般龋病进展较慢,都属于慢性龋。慢性龋包括光滑面龋、邻面龋、点隙窝沟龋和根面龋,其微生态特点已在前文讲述。

(二) 猛性龋

猛性龋,又称猖獗龋(rampant caries),包括婴儿奶瓶龋、儿童早期龋、放射性龋以及药物相关龋等多种类型。病变进展较快,多数牙及牙面在短时间内同时患龋。

儿童猛性龋患者中,唾液分泌型 IgA 和皮质醇水平显著升高,而一氧化氮水平则显著降低,提示宿主防御因素在猛性龋放生中的潜在作用。在微生物方面,儿童猛性龋患者唾液变异链球菌水平和念珠菌水平则出现显著升高,龋损部位菌斑中,变异链球菌和表兄链球菌比例亦有明显增加,优势菌包括变异链球菌、韦荣球菌属和乳杆菌属细菌,健康牙面菌斑则以除变异链球菌外的其他产多聚糖链球菌和放线菌为主。近期一项研究显示,迟缓真杆菌、副血链球菌、普雷沃菌属细菌等均可能与严重儿童早期龋相关。

成人猛性龋多发生于口腔环境产生剧烈变化的人群,如因放疗或药物治疗导致的唾液分泌显著下降的人群以及口干症患者。唾液分泌不足可导致进食糖类食物后糖与酸的清除率降低,促进生物膜的酸性化。唾液分泌不足最常见的原因是药物治疗,头颈部肿瘤放疗、自身免疫性疾病(如舍格伦综合征)、内分泌失调、神经失调或心理精神性疾病亦可导致。基于放疗人群的纵向研究显示,在放疗导致的永久性唾液分泌减少的人群中,进食糖类后,菌斑酸化程度和时间都大大增加,唾液与菌斑变异链球菌、乳杆菌属细菌和念珠菌属细菌数量及比例明显增加,其中乳杆菌属细菌的增加滞后于变异链球菌,证实了唾液分泌量严重不足所造成的酸性环境促使耐酸菌的增加;其中变异链球菌与龋病发生相关,乳杆菌属细菌则是龋病进展期间环境变化选择的结果,因为乳杆菌属细菌耐酸性尤胜变异链球菌。念珠菌属细菌具有明显的产酸能力和耐酸性,其数量增加不仅是环境酸性化的结果,也是肿瘤治疗导致的宿主免疫抑制的后果。

三、不同阶段龋病的微生态特点

(一) 初龋

初龋即龋病的初始阶段,此时尚未形成龋洞,仅为病变部位的釉质脱矿,临床表现为白垩斑。釉质白垩斑表面菌斑的变异链球菌比例往往高于临床健康部位的菌斑,但非变异链球菌群的链球菌仍是白垩斑微生物群的主要成员。研究显示,即使没有变异链球菌和乳杆菌属细菌的参与,早期在牙面定植的菌群也可造成釉质的破坏。

(二) 深龋

生态学中"深龋"的概念指已形成临床可见的龋洞的阶段,与组织解剖学中的"深龋"概

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

念具有一定差异。在形成龋洞的病损部位(包括猛性龋),变异链球菌可达到细菌总数的30%以上,提示变异链球菌与龋病的进展阶段具有密切联系。但在处于牙本质的病损进展前沿,变异链球菌的检出率反而相对较低,乳杆菌属、普雷沃菌属和双歧杆菌属细菌则更为多见。

随着龋病病损程度的发展,牙面微生物群的组成也在随之变化,由健康状态下非变异链球菌群链球菌和放线菌为优势菌逐渐转变为以包括变异链球菌在内的链球菌属以及乳杆菌属、双歧杆菌属细菌为优势菌。最新的分子生物技术研究显示,健康牙面和龋坏牙面菌斑的微生物组成差异巨大,由成百上千种不同种属的细菌构成,其中50%～60%都是不可培养的微生物。这些结果再次提示,除了变异链球菌外,尚有多种细菌包括乳杆菌属、双歧杆菌属、丙酸杆菌属、非变链菌群链球菌以及放线菌属细菌共同参与了龋病的发展。

第四节　龋病治疗中的生态学原则

牙菌斑生物膜是一种典型的生物膜。牙面微生物生物膜的生态失衡将导致龋病的发生。因此,生物膜控制是龋病控制的关键。

一、窝洞预备及消毒

窝洞预备除了应遵循牙体组织的生物学特点,根据机械力学原理来进行外,还应遵循若干生态学原则。

(一) 去净龋坏组织

龋坏组织包括破坏层和细菌侵入层,其中含有大量细菌及其代谢产物,为防止发生继发龋,原则上必须去净龋坏组织,并在修复前进行有效的窝洞消毒。

(二) 避免微渗漏

充填修复体-牙体界面的微渗漏是引起继发龋和充填失败的主要原因,微生物及其代谢产物从微渗漏部位进入牙体组织,还可进一步通过牙本质小管刺激牙髓,引起牙髓症状。因此,避免微渗漏是确保充填治疗成功、保持牙髓健康的重要保证。在窝洞预备过程中应做到:

1. 外形先应尽量避开牙尖和嵴等承受咬合力的部位。
2. 外形线应呈圆滑曲线,减少应力集中,确保材料充分充填材料入窝洞。
3. 邻面颊舌洞缘应位于接触区外,以便于自洁与机械清除。
4. 避免形成无基釉。
5. 洞缘角成短斜面,利于粘接,确保充填修复体与牙体具有最大强度,形成良好的边缘封闭,防止材料聚合收缩或承受咬合力后出现材料或牙体破损及微渗漏。

二、材料选择

微渗漏导致的继发龋在导致充填物更换的事件中占60%以上。研究显示,继发龋生物

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

膜中,专性厌氧菌比例大大高于专性厌氧菌,而材料成分对微生物组成没有明显影响。

避免微渗漏是确保充填治疗成功、保持牙髓健康的重要保证。然而,临床上广泛应用的树脂材料的聚合收缩以及修复过程中产生的收缩应力都有可能造成微渗漏。一方面,通过改善树脂性能,降低聚合收缩;另一方面,在树脂材料及粘接材料中加入抑菌剂(如季铵盐或含氟材料)亦可预防继发龋形成,降低治疗失败风险。

龋病是一种内生性疾病,其病因是微生物微生态系统从互惠共生(mutualistic symbiosis)向寄生共生方向(parasitic symbiosis)的转化,即微生物从动态平衡向酸选择导致的耐酸阶段的转化。包括变异链球菌在内的所有产酸或耐酸菌均参与了龋病过程。产酸是牙体脱矿的直接原因,同时,产酸也是通过酸适应和酸选择影响口腔微生物群落的表现型和基因型的决定性因素。产酸或耐酸菌增加是龋病过程中微生物产酸的结果而非原因,因此通过抗微生物治疗、基因治疗等方法特异性去除耐酸细菌(如变异链球菌)可能并不是有效的长效防龋方法。防止牙菌斑生物膜酸化进行微生物群的环境控制可能是真正有效的手段。

在生物膜脱矿-再矿化作用下,龋病病程较为缓慢。但如果发生局部环境的明显改变,如频繁的糖摄入、唾液分泌不足,若合并口腔卫生不佳,则脱矿-再矿化平衡被打破,向矿物质丢失方向移动。这一过程可能导致猛性龋的发生,其中儿童早期龋和放射性龋最具代表性。龋病过程是可逆的,通过控制局部微环境可以达到逆转病程的目的,确保互惠共生微生物群在临床健康条件下保持稳定是关键。龋病微生物及生态研究将来的方向可能会集中于如何保持牙菌斑生物膜的动态稳定及其生理机制方面。

(李继遥　王人可)

参考文献

1. 周学东,施文元. 微生物生物膜与感染. 北京:人民卫生出版社,2012
2. Fejerskov O, Kidd E. Dental Caries: The disease and its clinical management. UK: Blackwell Munksgaard, 2008
3. Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral disease. International Congress Series, 1284:103-112
4. Wilson RF, Ashley FP. Collection and biochemical analysis of human dental plaque from the approximal tooth surfaces and comparison with plaque from free smooth surfaces. Arch Oral Biol, 1988, 33:473-478
5. Wilson RF, Ashley FP. The effects of experimental variations in dietary sugar intake and oral hygiene on the biochemical composition and pH of free smooth-surface and approximal plaque. J Dent Res, 1988, 67:949-953
6. Beighton D, Brailsford S, Samaranayake LP, et al. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. Community Dent Health, 2004, 21:96-101
7. Fejerskov O, Silness J, Karring T, et al. The occlusal fissure of unerupted third molars as an experimental caries model in man. Scand J Dent Res, 1976, 84:142-149
8. Hashimoto K, Sato T, Shimauchi H, et al. Profiling of dental plaque microflora on root caries lesions and the protein-denaturing activity of these bacteria. Am J Dent, 2011, 24:295-299
9. Preza D, Olsen I, Aas JA, et al. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. J Clin Microbiol, 2008, 46:2015-2021
10. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, et al. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. Infect

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

Immun, 1975, 11: 1252-1260

11. Loesche WJ, Straffon LH. Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. Infect Immun, 1979, 26: 498-507

12. Boue D, Armau E, Tiraby G. A bacteriological study of rampant caries in children. J Dent Res, 1987, 66: 23-28

13. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res, 2011, 90: 294-303

14. Mo SS, Bao W, Lai GY, et al. The microfloral analysis of secondary caries biofilm around Class Ⅰ and Class Ⅱ composite and amalgam fillings. BMC Infect Dis, 2010, 10: 241

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



第十一章 牙髓根尖周病微生态

牙髓是牙齿中唯一的软组织，位于由牙本质形成的牙髓腔内，仅借狭窄的根尖孔及根尖区的侧支根管与根尖周组织相连。它主要由结缔组织、血管、神经及各种细胞组成。由于牙髓被无让性的牙本质包裹，没有有效的侧支血液循环，组织压较高（0.8～1.3kPa），因此，牙髓组织是一种比较特殊而易受伤害的微生态区，一般情况下，牙髓一旦损伤难以恢复，易产生疼痛甚至牙髓炎症坏死。

第一节　牙髓根尖周组织的微生态区

牙髓与相应的髓腔形态相似，是具有黏性和弹性的凝胶状软组织。恒牙的牙髓容量约为0.38ml，其中磨牙牙髓多于切牙，约为切牙的4倍。

牙髓分为冠髓和根髓两部分。冠髓位于牙冠部，向牙尖部突出形成髓角，在牙颈部与根髓融合。年轻恒牙的冠髓与牙冠形态相似，包括殆面、近中面、远中面、颊面、舌面和髓底6个面。随年龄增长，继发性牙本质沉积，髓腔变小，冠髓体积也缩小。不同牙齿髓角的数目取决于牙尖的数目。

根髓由牙颈部延伸至根尖孔。前牙根髓单一，由唯一的根尖孔与根尖周组织相连；后牙牙根众多，根髓呈锥形，通过不同的根尖孔与外界组织相连。与冠髓相同的是，随着年龄增大，继发性牙本质沉积，根髓体积也逐渐缩小，根管也因继发性牙骨质的沉积变狭窄。

根尖孔是牙髓通往根尖周组织的开口，大小约为0.3～0.6mm，上颌牙略大于下颌牙。大多数根尖孔位于新形成根尖的中央，随着年龄增加则逐渐偏移中心，开口于根尖侧方。如果根尖处有多个开口与根尖周组织通连，则较大的开口称为根尖孔，其余的侧方开口称为侧支根管。侧支根管在恒牙中的发生率约为33%，主要位于根尖孔侧方或多根牙的根分叉处。无论根尖孔还是侧支根管，均是牙髓与根尖周组织相通连的开口，因此炎症可以通过它们在牙髓及根尖周组织中扩散。

一、牙髓微生态区

牙髓分为中央区（central zone）和外周区（peripheral zone）。中央区即固有牙髓，是牙髓组织的核心和主体，由较粗大的动静脉血管、神经纤维及包裹在其周围的成纤维细胞和胶原纤维组成；外周区又称为成牙区（odontogenic zone），包括成牙本质细胞层、无细胞层（cell-free zone）和多细胞层（cell-rich zone）。成牙本质细胞层位于牙髓最外层，由成牙本质细胞体

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

构成，细胞间分布有神经纤维和毛细血管形成的纤维丛；无细胞层也称魏氏层（zone of Weil or Weil's basal layer），位于成牙本质细胞下方，主要由无髓鞘的神经纤维、毛细血管和成纤维细胞的胞质突构成，细胞成分少；多细胞层位于无细胞层的下方，紧邻固有牙髓，由大量的成纤维细胞和未分化的间质细胞组成，该层在冠髓区较根髓区明显。

（一）细胞

牙髓的细胞成分包括成牙本质细胞、成纤维细胞和其他细胞等。

1. 成牙本质细胞　成牙本质细胞具有形成牙本质的功能，分布在牙髓外层，呈栅栏状排列，但在髓角区，由于细胞过度拥挤也可呈假复层状排列。细胞的大小和形状随所在部位和功能状态有所不同。冠髓区细胞较大，呈高柱状；根髓区细胞较小，呈矮柱状或立方状；根尖区细胞为扁平状。由于冠髓区成牙本质细胞是分泌形成牙本质的主要细胞，因此含有较多的细胞器，体积较大，卵圆形的细胞核位于基底区，高尔基复合体紧邻胞核分布在靠近牙本质一侧，大量粗面内质网和线粒体散布于胞质中；没有功能的衰老细胞则逐渐丧失细胞器，体积减小。成牙本质细胞突是成牙本质细胞伸向牙本质小管的细胞突起，其在靠近牙髓端含有少数线粒体，远离牙髓进入矿化牙本质后，细胞器减少，主要含有一些微管和微丝。这些微管和微丝延伸至釉牙本质界，传递胞内物质并支持细胞突。相邻的成牙本质细胞之间有 3 种连接复合体：紧密连接、间隙连接和中间连接。紧密连接围绕细胞形成带状区域，维持细胞之间的相对位置，阻止牙髓中的物质渗漏进入牙本质。相邻成牙本质细胞之间可以通过间隙连接进行电冲动及小分子物质的传导沟通。基于此，成牙本质细胞之间具有同步性，当刺激到达成牙本质细胞层时，可通过间隙连接将信息迅速传递到整层细胞，构成牙髓组织的一道防御屏障。

2. 成纤维细胞　成纤维细胞是牙髓中的主体细胞，数目最多，它们分布于整个牙髓，特别密布于多细胞层。在年轻牙髓中，成纤维细胞功能旺盛，产生胶原纤维和明胶状基质，卵圆形的胞核居中，周围分布大量的高尔基复合体、粗面内质网和线粒体，同时伸出多个粗大的细胞突起；当细胞衰老或功能降低时，细胞体积变小，细胞器数目减少，呈梭形。

3. 其他细胞　牙髓中除了成牙本质细胞和成纤维细胞外，还有施万细胞、内皮细胞、巨噬细胞和未分化的间质细胞等。施万细胞形成神经髓鞘，内皮细胞衬布于牙髓的动静脉和毛细血管壁上，未分化的间质细胞分布于血管周围。这些间质细胞是牙髓细胞的储备库，当牙髓暴露或需要形成修复性牙本质时，它们可根据需要分化为新的成牙本质细胞或成纤维细胞。巨噬细胞吞噬细菌、异物或坏死细胞，同时呈递抗原，参与免疫反应。淋巴细胞、树突细胞、肥大细胞等也存在于正常牙髓中，参与牙髓的免疫反应。

（二）细胞间成分

牙髓细胞间成分包括胶原纤维、不定形基质和细胞间组织液，它们对于维持牙髓结构的完整性和牙髓的生理功能有重要作用。

1. 胶原纤维　胶原纤维是围绕细胞的主要胞外基质。它们交织成松散和不规则的网状，包括Ⅰ型胶原和Ⅱ型胶原两种类型。由于牙本质是成牙本质细胞所形成，由Ⅰ型胶原组成，牙髓中的Ⅰ型胶原也是由成牙本质细胞分泌合成，Ⅱ型胶原则由成纤维细胞合成。在年轻牙髓中，胶原纤维较少，排列稀疏，随年龄增大，胶原纤维增多，形成束状；当牙髓受到刺激时，纤维还会迅速累积。

2. 基质及组织液　基质是细胞间的无定形明胶状物质，其主要化学成分是蛋白多糖。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

牙髓中有两种具有不同多糖成分的蛋白多糖，即透明质酸和硫酸软骨素，在牙髓组织中前者多于后者。基质包绕和支持牙髓中的各种结构，在血管与细胞之间传递营养物质和废物，同时抵抗细菌和毒性产物在牙髓组织中扩散。炎症时，黏性基质将组织压升高局限在受损区局部，避免扩散到整个牙髓，同时局部也可能由于组织压的过度升高，导致静脉管腔闭缩、血液淤滞、局部组织缺血，从而引起局部细胞坏死。

组织液来源于毛细血管，其成分与血浆相似。正常情况下，各种可溶物可通过组织液在基质与血管之间流动，达到平衡。当发生炎症反应时，血管通透性增加，组织液急剧增加导致局部组织压迅速升高。正常情况下，牙髓组织中的组织液可通过牙本质小管进入牙本质内，营养牙本质。

（三）血液循环

牙髓血液来源于上、下牙槽动脉。动脉经根尖孔进入牙髓后，在牙髓中央区向冠部行走，沿途向周边发出分支，最后在成牙本质细胞下层形成密集的毛细血管网，以满足邻近成牙本质细胞层和多细胞层内细胞的功能需要。牙髓（尤其是根髓）中存在动静脉的直接吻合，当炎症反应使组织压升高时，这些吻合的血管可以开通，从而降低组织压，维持牙髓的正常稳态。

由于牙髓被无让性的牙本质所包裹，因此牙髓中的血管壁较薄，这种极薄的管壁能选择性地渗透电解质和一些小分子物质。但当炎症发生时，血管壁过度扩张，内皮细胞受损，选择性渗透能力降低，大量水分进入组织，导致组织渗透压升高，发生水肿。

大量研究表明牙髓中也有淋巴管，其形状不规则，管壁薄，基底膜不连续，大分子物质及细菌均能够进入淋巴管中。炎症时，淋巴管可通过转运组织液、蛋白成分、细胞碎片和细菌等，起到降低组织压、缓解早期炎症反应的作用。

（四）神经

牙髓中有丰富的神经分布。粗大的神经纤维从根尖孔进入根管后，穿过根髓向冠方行走，逐渐向周边分出细小分支，在成牙本质细胞下层形成一个密集的神经纤维层，即神经壁层（parietal layer of nerves）。该层神经纤维在髓顶和髓室壁处较明显，而在根管内则较少见，包括有髓鞘神经纤维和无髓鞘神经纤维。离开壁层后，神经纤维进入成牙区，其中大部分神经末梢分布于髓角，少数与成牙本质细胞接触，还有部分神经末梢进入牙本质小管，作为疼痛感受器发挥作用。除此以外，牙髓中央的大血管周围也有神经末梢分布，其轴突内有许多小泡，参与调控血管收缩和舒张。

产生疼痛是牙髓神经的一个主要功能。由于牙髓内仅有疼痛感受器，因此当它们受到各种外界刺激（如机械、温度、化学或压力刺激）时，其冲动传递到中枢都是痛觉。但是，牙髓疼痛有一大特点，其感受痛觉的部位（如釉牙本质界或内层釉质）并没有神经纤维末梢分布，大部分神经末梢均远离这些部位，分布于牙髓表面或进入牙本质小管，与成牙本质细胞及其突起关系密切。因此，关于牙髓产生和传导痛觉的机制目前仍不清楚，学者们提出了各种理论用以解释这一现象。第一种理论认为神经末梢进入釉牙本质界，直接感受外界刺激产生疼痛。

在电子显微镜下釉牙本质界处并没有神经末梢分布；第二种理论称为传导理论（transduction theory），认为成牙本质细胞突起即是痛觉感受器，可以将外界刺激传导至牙髓，兴奋神经纤维；第三种静水压理论（hydrodynamic theory）详细解释了痛觉在牙本质中传导的过

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

程，因此被广泛接受。该理论认为，当成牙本质细胞突起受到刺激后，会在牙本质小管内产生移动，接触到位于内层牙本质或牙髓内的神经末梢，使其变形并作为机械刺激感受器发挥作用。支持这一理论的发现有，成牙本质细胞突起与神经末梢密切关联，相互交错；当牙本质受到冷刺激时，细胞突起向外移动，受到热刺激时向内移动；牙本质小管液也会因切割牙本质而产生流动。

（五）牙髓的功能

牙髓具有营养功能、形成功能、修复功能和保护功能等，其中最重要的是营养功能。牙髓通过成牙本质细胞及其突起以及组织液向牙本质提供氧、营养物质来保持牙齿活力，其内的毛细血管网是牙髓行使营养功能的基础。根管治疗后尽管牙齿仍能在牙髓丧失的情况下继续行使功能，但是牙髓对牙齿的营养功能消失，牙本质脆性增加。

牙髓可以通过成牙本质细胞在牙的整个生命过程中不断形成牙本质，因此具有形成功能，但其形成牙本质的速率和形式在牙齿发育不同时期有所不同。早期形成的牙本质即原发性牙本质（primary dentin）是管状的且排列有规律，主要原因是此期的成牙本质细胞排列不拥挤，牙齿尚未行使功能。随着成牙本质细胞分泌基质并逐渐后退，细胞之间会变得拥挤，排列也会变得紊乱，加之牙齿开始行使咬合功能，此时形成的牙本质呈波纹状，形成速度也相对变慢，称为继发性牙本质（secondary dentin）或功能性牙本质。当牙齿受到外界刺激时，会诱发牙髓的修复功能，形成修复性牙本质。龋病、磨损、酸蚀症和备洞等会导致牙本质暴露，成牙本质细胞变质，此时邻近的成牙本质细胞和未分化的间质细胞可代替这些变质的细胞在受损区形成修复性牙本质（reparative dentin）或第三期牙本质（tertiary dentin）。这些牙本质形成速度快，小管数目少甚至缺乏，其形态不规则，不含成牙本质细胞突，形成类似骨组织样外观，因此又称为硬化性牙本质（sclerotic dentin）。在硬化性牙本质中，牙本质小管被堵塞，外界刺激不能影响牙髓，从而起到保护牙髓、保存牙齿活力的作用。

牙髓还有保护功能。在受到外界刺激时，牙髓感觉神经纤维向中枢系统发放冲动而引发痛觉，并通过肌肉运动和血液变化等痛反应发挥保护作用，使牙髓免遭进一步的损害。炎症反应是牙髓组织对损伤因子所产生的防御性反应，是牙髓保护功能的另一种表现。当牙髓受到损伤时，各种炎症因子使毛细血管的通透性增加，血管中的液体和中性粒细胞进入受损区，吞噬并中和受损区的刺激物。若刺激物被及时清除，局部牙髓损伤可以得到修复；若刺激物毒力较强，大量中性粒细胞就会进入组织，形成脓肿，最后甚至引起整个牙髓坏死。

（六）牙髓退行性改变

牙髓退行性改变（regressive changes）是指外界环境刺激和年龄增加导致牙髓在体积、结构和功能上所发生的一系列生理性变化。

1. 体积变化　由于成牙本质细胞不断形成继发性牙本质，随着年龄增长，牙髓腔体积不断缩小，髓室由大变小，髓角由高变低甚至消失，根管由粗变细，根尖孔变窄。而磨损、磨耗或备洞等治疗措施则在局部受损区形成修复性牙本质，加速髓腔变小的速度，甚至使髓腔完全闭塞。另一方面，年龄增长及慢性损伤等也使牙本质出现硬化性改变，牙本质小管堵塞。因此，位于牙髓腔内的牙髓组织随着髓腔体积的改变而变化。

2. 结构变化　随着年龄增加，牙髓细胞数目减少，细胞质和细胞器也减少；成牙本质细胞由高柱状变为立方状或扁平状，在磨牙髓室底处甚至消失，提示细胞功能降低。尽管牙髓细胞减少，胶原纤维合成减少，但是由于成熟的胶原纤维不能从牙髓中清除，在牙髓中累积

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

增多。因此，随着年龄增加，牙髓逐渐出现纤维变性，甚至阻塞髓腔。除此以外，磨损、磨耗和龋洞等慢性损伤也是牙髓纤维变性的一个重要原因。

在衰老或损伤的牙髓中，神经和血管数目明显减少，牙髓出现营养不良性钙化。钙盐可沉积在变性或坏死的细胞、血管壁、神经纤维及胶原纤维上，在根管内形成弥散性钙化，堵塞根管腔；同时，也可能在局部形成圆形或卵圆形的钙化物，即髓石（pulp stone or denticles）。无论是受过损伤或是外观正常的牙髓均可能出现髓石，甚至在未萌出的牙齿中也有可能形成，但其在老年人牙髓中出现的概率较大。髓石根据其结构不同分为真性髓石（true denticles）和假性髓石（false denticles）。真性髓石由牙本质小管样牙本质构成，表面有成牙本质细胞覆盖，细胞突伸入小管内；假性髓石则由同心圆状钙化物形成，其中心为坏死细胞形成的钙化核。所有髓石在刚开始形成时体积较小，随后体积逐渐增大，堵塞髓腔。它们或者游离于髓腔内，或者紧贴牙本质壁，甚至可能被牙本质所包埋，在同一颗牙中有同时出现三种髓石的可能，但最常见的还是游离在髓腔中的髓石，且以假性髓石居多。有学者认为，随着牙本质在髓腔侧的沉积，游离在髓腔中的髓石会逐渐与牙本质壁接触，最终被牙本质包裹。

3. 功能变化　随着牙髓中细胞成分减少，牙髓的各种功能会逐渐降低。根尖孔变窄，牙髓血流受限制，细胞因缺乏足够的营养物质和氧而逐渐丧失其在防御和修复方面的功能。同时，大量继发性和修复性牙本质的形成，使得牙本质通透性下降，牙髓对外界刺激的敏感性降低，一旦牙髓受损，因其修复功能降低，其痊愈基本是不可能实现的。

二、根尖周组织微生态区

根尖周组织是指位于根尖部的牙周组织，包括牙骨质、牙周膜和牙槽骨。由于根尖周组织与周围组织无牙本质阻隔，与周围组织存在直接相同，因此其组织再生和抵抗微生物侵袭的生态能力好于牙髓组织。

（一）牙骨质

牙骨质是覆盖在牙根表面的一层较薄的硬组织，主要有两大功能，其一覆盖根部牙本质，封闭牙本质小管，防止外界刺激影响根部牙本质及其通过牙本质小管侵袭牙髓组织；将牙周膜纤维附着于牙根上，使牙齿能够牢固地固定于牙槽窝内。

牙骨质包括无细胞性牙骨质和细胞性牙骨质。前者分布在牙根冠方2/3，为薄的板层状结构，是上皮根鞘细胞降解之前沉积而成；后者位于根尖1/3，为较厚的不规则板层状，是一层特殊的硬组织。无论大体上还是组织学上，细胞性牙骨质均与骨组织相似，细胞位于牙骨质陷窝内，但是牙骨质中并不含有血管、神经和哈弗斯管，因此其对疼痛不敏感，对吸收也较骨组织具有更强的抵抗性。

细胞性牙骨质直接沉积在无细胞性牙骨质表面，其在颈部厚约30～60μm，到根尖处则逐渐增加至150～200μm厚。随着牙骨质厚度增加，其中所含的细胞数目也增加。在显微镜下可见靠近牙骨质表面的陷窝内有大量活跃的细胞，其与蛋白分泌相关的细胞器如高尔基复合体、粗面内质网和线粒体等，在胞质中较明显；而在牙骨质深层的陷窝内常常缺失细胞，说明细胞与牙骨质的分泌功能密切相关。正常情况下，成牙骨质细胞首先分泌一层胶原基质，即类牙骨质，随后基质矿化包裹成牙骨质细胞形成细胞性牙骨质。

在人的一生中，根尖1/3不断有细胞性牙骨质沉积，以补偿牙冠的磨耗。这种不断沉积

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的特点使牙根不断增长，根尖孔逐渐缩小，血液进入牙髓受阻，牙髓发生退行性或增龄性改变。同时，生理根尖孔距解剖根尖孔的距离越来越大，影像学检查使根管充填材料距影像学根尖的距离越来越大，导致临床上容易误判根管欠填。随着年龄增加，牙骨质相对光滑的表面也变得不规则，这主要是因为牙周韧带在附着处钙化所致，尤以根尖处最为明显。衰老牙骨质的另一个特征是牙骨质吸收。牙骨质吸收的同时又有新的牙骨质沉积在缺损处，形成一条反转线（reversal lines）。

（二）牙周膜

根尖周牙周膜位于根尖牙骨质和牙槽骨之间，通过根尖孔与牙髓相通连，由成束的胶原纤维构成。胶原纤维呈放射状排列，一端附着于牙骨质内，一端埋入牙槽骨，对牙齿起支持和悬吊作用。纤维间隙之间有大量血管、神经和淋巴管形成的网络状结构，对维持牙周膜的活性至关重要。

牙周膜中的血供主要来源于上下牙槽动脉和面动脉，这些血管在牙周膜内形成血管网，动静脉之间相互吻合交通，为牙周膜组织的修复再生提供活力。一旦牙周膜发生炎症反应，炎性产物能通过丰富的血液循环被及时清除，使病变在合理治疗后容易恢复和痊愈。另一方面，牙周膜充足的血液供应还能营养牙骨质，使包埋于牙骨质内的胶原纤维仍具活力，维护正常的生理功能，因而经过治疗的无髓牙或死髓牙仍能保留于颌骨内并行使咀嚼功能。

粗大的神经干在经过牙周膜时，不断发出细小分支进入牙槽骨，一些分支还在胶原纤维束之间形成神经纤维丛。牙周膜中有两种感受器，即压力感受器和疼痛感受器，前者主要分布于牙周膜主纤维之间，其神经末梢被包裹于结缔组织中，可传导压力，发挥本体感受功能；后者主要传导痛觉，参与防御反应。因此，根尖周疼痛与牙髓疼痛是不同的，前者不仅可感受到痛觉，还能清楚地指出患牙位置，而后者则因为缺乏本体感受器，仅有疼痛感觉而无法清楚指出具体疼痛部位。

根尖周牙周膜中有多种细胞，包括成纤维细胞、成骨细胞、成牙骨质细胞、巨噬细胞和破骨细胞等，其中成纤维细胞数目最大，一方面细胞合成分泌新的胶原纤维，另一方面又吞噬旧的纤维组织，从而维持胶原纤维的更新。成骨细胞分布于牙槽骨表面，成牙骨质细胞则靠近牙骨质，两者均由局部未分化的间质细胞分化而来，参与根尖周牙周膜组织的改建。巨噬细胞因其吞噬能力和高趋化性而成为牙周膜组织中重要的防御细胞，它可以吞噬细菌、坏死细胞和异物，参与根尖周组织的免疫反应。淋巴细胞、白细胞和浆细胞等也是根尖周组织抵御疾病的主要成员。根尖周牙周膜内还含有来源于上皮根鞘的细胞团块，即牙周上皮剩余，它在受到炎症刺激后可发生增殖，与根尖周囊肿的形成密切相关。

随着年龄增加，牙周膜组织中的细胞数目和活力下降，正常的组织功能也减退，牙骨质和牙槽骨表面因衰老形成扇贝状外观，此时牙周膜纤维不再附着于整个硬组织表面，而是仅附着于扇贝顶端，这是衰老牙周膜组织的一个典型特征。

（三）牙槽骨

牙槽骨是上下颌骨包绕牙根的部分，由固有牙槽骨和支持骨构成。

固有牙槽骨是包绕牙根的一层致密骨，也是牙周膜纤维附着的地方，在X线片上表现为围绕牙根的连续阻射影像，因此又称为硬骨板。如果硬骨板密度降低，影像变模糊或中断，则提示牙槽窝骨壁内有感染、炎症和骨吸收存在。显微镜下，固有牙槽骨分为两种，一种含有胶原纤维，另一种则与身体其他部位的密质骨外观相似。前者的纤维来自牙周膜，一端附

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

着于牙骨质,一端埋入牙槽骨,形成穿通纤维,即沙比纤维(Sharpey's fibers)。尽管硬骨板上有许多小孔供神经、血管进出,又被称为筛状板,但由于其矿物质含量高、密度大,在X线片上仍呈不透明的阻射影像,这种筛状特点也使牙周间隙不至于处在一个完全密闭的环境中。因此,根尖周炎时,压力升高引发的疼痛远没有牙髓炎那么厉害。

支持骨包括密质骨和松质骨,前者与身体其他部位的密质骨结构相似,主要位于唇颊侧和舌侧。血管在哈弗斯管中穿行,运送氧和营养物质,并相互沟通。松质骨则主要由骨小梁及其间的骨髓腔构成,骨髓腔内有大量造血细胞、前成骨细胞和脂肪组织。

随着年龄增大,骨密度降低;牙槽窝骨壁由平滑变粗糙,呈锯齿状;骨质丧失,纤维变少,骨陷窝内有活力的细胞数目下降;脂肪组织占据骨髓腔,其造血功能和成骨能力均降低;骨质疏松现象随年龄增大愈发明显,牙齿也因支持组织减少而松动。

第二节 牙髓根尖周组织细菌感染生态

早在300多年以前,荷兰人Antony van Leewenhoek利用自制的单式显微镜在放大266倍后首次观察到牙垢里的"微生物"。W. D. Miller于1890年出版《人类口腔中的微生物》(Microorganisms of the Human Mouth),将牙髓病和根尖周病同细菌的存在联系起来,因此被认为是口腔微生物学创始人。Miller从坏死牙髓中分离出了细菌,并对其进行了相关生物致病性的研究,证实细菌在牙髓病变中的致病性。同时还提出,坏疽性的牙髓组织还可作为感染中心引起根尖周炎乃至致命性其他疾病,这也是后来"局灶感染学说"的起源。

一、牙髓根尖周疾病的细菌感染学说

研究证实细菌与牙髓病和根尖周病的密切关系。1965年,Kakehashi等用经典动物实验进一步证明了细菌在牙髓根尖周病发生中的重要作用。Kakehashi等人将普通鼠和无菌鼠牙开髓,牙髓暴露在口腔中42天,最终观察到普通鼠牙的牙髓均出现了牙髓坏死,且有根尖脓肿、肉芽肿形成,无菌鼠牙髓无明显炎症,未发现根尖脓肿、肉芽肿,并且有反应性牙本质桥形成,该结果充分说明细菌在牙髓、根尖周炎症中的作用,同时证明牙髓在没有感染的情况下,有一定的自我修复能力。

Moller等对26个牙髓无菌坏死的猴牙观察了6个月,发现这些猴牙仍保持无菌,除少数牙根尖周有轻度炎症细胞浸润外,大多数未引起根尖周任何病变。对猴牙根尖周模型的细菌学研究也发现,牙髓无菌坏死的猴牙在120~150天实验期内未产生根尖周炎,而暴露髓腔2周和接种了细菌的猴牙均引起了根尖周炎。实验发现伴有根尖周病变的受过创伤的牙根管中有细菌生长,而没有根尖病变的牙根管中没有细菌的生长。

根尖周炎症的严重程度与根管内的细菌和接触细菌时间的长短有关。坏死的牙髓组织的组织分解毒性产物和产生的自体抗原蛋白并不能引起根尖周炎症。在猴子的牙髓实验中,用无菌处理并充填根管,不会发生根尖周炎。相反,将感染的牙髓组织植入到根尖可引起根尖周炎。由此可以看出牙髓感染是根尖周炎发生发展的必不可少的前提条件。目前对牙髓根尖周病的有效治疗也是基于彻底去除根管内的感染物质,包括微生物及其产物,从而治疗或预防根尖周病的发生。

牙髓根尖周病是发生于牙髓和根尖周组织的感染性疾病,微生物作为其病因已得到公

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

认。在牙髓微生物的发展过程中，随着微生物学技术的发展，出现了不同时期的不同学说，其中影响较大的主要有局灶感染学说和感染微生态学说。

（一）病灶感染学说

1904年，F. Billings将“感染病灶”表述为有致病微生物的感染组织所在的限定区域。1909年，E. C. Rosenow将“病灶理论”表述为“细菌自远处感染灶通过血流引起的局部或全身的感染”。1910年，英国医师William Hunter在McGill大学为全校师生作了内容为“医学中的感染和抗感染”的讲座。Hunter批评了美国的更强调作充填术而不主张拔牙的牙科治疗方法。Hunter将充填术比作“大量感染的滋生地”，并且认为这样的治疗方法是美国许多疾病的原因，这些疾病包括苍白综合征、慢性消化不良、肠功能紊乱、贫血和精神紧张。1911年，William Hunter在《Oral Sepsis as a Cause of Disease》一书中首次提出牙髓根尖周病的局灶感染学说（focal infectious theory），书中提出感染的牙齿可引起身体其他部位的感染以及系统性疾病。这一观点一度导致人们不再寻求保存牙髓感染的患牙，而是拔除牙齿以免引发严重的后果。

此后不久，死髓牙以及做过牙髓治疗的牙受到牵连。Weston Price展开了一项为期25年的研究，探讨死髓牙和做过牙髓治疗的牙与病灶的关系。随着病灶理论的盛行，越来越多的牙医和医生建议拔除所有死髓牙和做过牙髓治疗的牙齿。口腔医学文献中充斥着拔牙后治愈疾病的报道，这些报道都是根据经验得出，没有充分的随访，但是这些报道却错误地支持了没有科学依据的拔牙。

20世纪30年代，病灶理论受到质疑，开始提倡重建式的而非破坏式的牙科治疗。1939年，Fish将有增殖力的细菌移植到豚鼠的腭部，结果有4个反应性的区域形成。多形核中性粒细胞将细菌限制在感染区域。感染区外是只有炎细胞而没有细菌的污染区。接下来是激惹区，其中含有组织细胞和破骨细胞。在此区域外是一主要由成纤维细胞、毛细血管芽以及成骨细胞组成的激活区域。Fish的理论认为，移除感染源后就会控制感染的扩散，这一理论成为成功根管治疗的基础。

现在，现代医学认为病灶理论中提到的做过牙髓治疗的牙同退行性疾病没有关系。近年出版《Root canal cover-up exposed》一书又重提以Rosenow和Price的设计粗略、过时的研究为基础的病灶理论，尽管这一研究已被证明是错误的。

牙髓感染可以波及其他组织，如果细菌侵入到根尖周组织，同时患者的免疫系统不能阻止细菌及细菌产物扩散的话，就会形成脓肿或者蜂窝织炎。这种感染会直接从一个解剖间隙向邻近的间隙扩散。这并非病灶理论的实例，在病灶理论中，细菌通过循环系统传播，并在远处形成新感染灶。

虽然与牙齿治疗相关的菌血症会将细菌带入血液循环系统，但这并不意味着牙髓治疗过的牙就会导致菌血症。血症的发生率和程度是同牙齿治疗中的出血量和损伤程度相关的。这些研究证实了非外科式的牙髓治疗与拔牙相比产生菌血症的概率是极低的。只要拔牙，就不同程度地加大了产生菌血症的可能。因此，对菌血症引起感染性心内膜炎易感的患者，应当选择牙髓治疗，而不是拔牙。

研究发现，菌血症发生的概率同非外科的根管器械相关，发生率从31%到54%。如果根管器械仅在根尖孔内1mm以内的范围操作，菌血症的发生率为4/13（31%）。如果根管器械（#15、#20、#25）在根尖孔外2mm的范围内操作，菌血症的发生率为7/13（54%）。临床上

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的根管内样品和血液中分离出来的细菌，具有相同的限制性酶切特征。这一鉴定方法说明，牙髓治疗过程中和治疗后，在血液中发现的微生物来源于根管。但是，要说明口腔感染同系统性疾病有因果关系，仅有菌血症的潜在关系是不够的。必须有更确凿的证据，证实口腔外的感染灶里的微生物来源于口腔。

成功完成根管治疗的牙齿，不应当与那些没有治疗、处于感染状态的根管系统以及那些因根尖周有脓肿而有可能造成菌血症的牙齿相混淆。患者每天因日常活动就能造成多次菌血症。由于学者们认识到成功的根管治疗能够避免对整个机体的危害，所以牙髓病学已经度过了病灶理论困扰的艰难时期。病灶感染学说对牙髓根尖周病治疗学的发展起到了一定的阻碍作用，但同时也使牙髓病治疗学的生物学基础得到了更深入的研究。

（二）牙髓根尖周病的感染微生态学说

大量研究证实，牙髓根尖周病感染微生物是以厌氧菌为主的混合感染，而这些细菌在正常人或患者口腔中均可检出，只是检出率及组成情况不同。感染微生态学说（infectious microecology）认为，牙髓根尖周感染是典型的由细菌易位引起的口腔生态失衡性疾病，易位的细菌或其致病产物通过不同途径侵入牙髓，破坏或改变牙髓组织原有的微生态，从而导致牙髓根尖周病的发生。

微生物间的相互作用和营养的需求，使得从感染牙髓中培养和鉴别所有的细菌变得非常困难。1970 年以前，因为没有足够的厌氧培养办法，所以无法分离和鉴别大多数专性厌氧菌菌株。厌氧菌在牙髓和根尖周致病过程中的重要作用，随着厌氧培养方法的发展以及选择性和非选择性培养基的使用而被揭示出来。但是，即使用最成熟的培养方法，还是有很多微生物不能够被培养出来。对比口腔正常菌群而言，感染根管中的细菌是一个有限的菌群。

直到 20 世纪 70 年代以前，根管内细菌学的研究主要提示了兼性厌氧菌的存在。70 年代以后，随着厌氧菌技术的发展和应用，越来越多的研究表明，厌氧菌才是感染根管内的优势菌。70% 以上的感染根管内可分离出多种厌氧菌，它们与牙髓病和根尖周病的临床症状和体征有密切的关系。目前认为，根管和根尖周的感染是以厌氧菌为主的混合感染，厌氧菌在牙髓病和根尖周病的发生和发展中具有重要作用。

近年来，随着微生物检测技术和手段的发展，牙髓病和根尖周病感染灶微生物组成被证实更为复杂，但也更加全面，检测出了大量新的细菌，并且很多细菌的检出率大大提高，同时很多非细菌微生物也陆续从感染根管和根尖周病灶中检出。它们或单独致病，或与其他微生物协同参与疾病的发生。参与疾病发生或发展的非细菌微生物主要包括真菌（假丝酵母菌）、古生菌、口腔螺旋体以及病毒（疱疹病毒）等。

正常情况下，牙髓位于密闭的髓腔内，牙髓中的血管、神经和淋巴管通过根尖孔与根尖部的牙周组织相连通。但当牙齿受到龋病、磨损、创伤或医源性因素等破坏釉质或牙骨质的完整性时，牙本质甚至牙髓会暴露于口腔而导致牙髓感染。引发牙髓感染的途径主要包括暴露的牙本质小管、牙髓暴露、牙周袋途径和血源感染，而根尖周的感染主要是继发于牙髓感染。

侵入牙髓和根尖周组织的细菌，是否引起组织的病变以及导致组织损伤的程度，除了与细菌的毒力和数量有关外，还与宿主的防御能力相关。细菌可产生多种有害物质，主要包括荚膜、纤毛、胞外小泡、内毒素、酶和代谢产物，它们可直接毒害组织细胞，或通过引发非特异

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

性的炎症反应和特异性的免疫反应间接导致组织损伤。

菌体的许多成分具有抗原性，通过诱发机体免疫反应，可间接造成组织损伤。

用微生态的观点研究牙髓根尖周病的病因和病理，有助于更好地阐明牙髓根尖周病的发病机制，对其认识也是全面和辩证的。

二、细菌对牙髓根尖周组织的感染路径

细菌感染是牙髓病、根尖周病最常见的原因，也是最主要的致病因素。目前已确定牙髓根尖周病是以厌氧菌为主的混合感染，也有真菌和其他微生物类型的存在。炎症牙髓中的细菌无明显特异性，细菌的种类与牙髓的感染途径和髓腔开放与否有关。临床上所见的牙髓病多继发于龋病，故炎症牙髓中分离到的细菌多为牙本质深层的一些细菌，主要是兼性厌氧球菌和厌氧杆菌，如链球属菌、乳杆属菌、放线菌属和革兰阴性杆菌等。牙本质深层是一个相当缺氧的环境，有利于上述细菌的生长和繁殖。

引起根尖周炎的细菌可以从感染根管内分离到。感染根管是指含有细菌和感染坏死牙髓组织的根管。自 20 世纪 70 年代以来，随着微生物取样、转运、厌氧培养技术的不断进步，研究表明感染根管内通常是 5～8 种细菌的混合感染，其中以 1～2 种细菌为优势菌。厌氧细菌（尤其是专性厌氧细菌）是感染根管内的优势菌群，包括产黑色素拟杆菌属、拟杆菌属、梭杆菌属、消化链球菌属和放线菌属等。

正常情况下，牙髓位于密闭的髓腔内，牙髓中的血管、神经和淋巴管通过根尖孔与根尖部的牙周组织相连通。当龋病、磨损、创伤或医源性因素等致使釉质或牙骨质的完整性遭到破坏时，牙本质甚至牙髓会暴露于口腔而导致牙髓感染。引发牙髓感染的途径主要包括暴露的牙本质小管、暴露的髓腔、牙周袋途径和血源感染，根尖周的感染主要是继发于牙髓感染。

（一）通过冠方牙体组织

1. 通过牙本质小管　一般认为，只要有健康的牙髓牙本质复合体存在和阻挡，细菌则不会大量进入牙髓组织。研究发现，当细菌侵入牙本质的深度距髓腔<1.1mm 时，牙髓即可出现轻微的炎症；当健康牙本质厚度<0.5mm 时，牙髓发生明显的炎症；当健康牙本质厚度<0.2mm 时，组织学观察可见牙髓中有细菌存在。牙髓炎的不同时期，细菌侵入的程度不同。少量细菌通过龋损破坏的牙本质小管能够进入未暴露的健康的牙髓组织，但这些细菌一般能被牙髓组织的自身防御系统消灭。

一些牙体硬组织的非龋疾病如楔状缺损、磨损、牙体发育畸形等，也可造成釉质或牙骨质的缺损；此外，在龋病治疗时，窝洞充填前未去净的细菌亦可通过牙本质小管引发牙髓感染。

2. 通过暴露的髓腔　深龋或者较严重的非龋性疾病，如磨损、牙折、楔状缺损、牙隐裂、牙内陷、畸形中央尖等，可以导致牙本质小管暴露或直接导致牙髓暴露，细菌可以直接侵入牙髓组织，是引起牙髓感染的主要原因，这种情况最为常见。

正常情况下，宿主的防御能力与细菌的致病能力之间保持动态平衡关系。外界侵入的微生物被机体清除而不会致病，在健康牙髓中一般找不到细菌。当大量细菌或致病力强的细菌进入牙髓组织，宿主的防御能力与细菌的致病能力之间的平衡被打破，引起牙髓组织感染或坏死。根管内的细菌和代谢产物可以通过根尖孔或侧支根管扩散至根尖周组织，继续

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

引起根尖周病变。

3. 通过感染的根管　感染或坏死的牙髓组织、根管内的细菌及其毒素，通过主根管孔、侧支根管或牙本质小管继续扩展至根尖周围组织，最终导致根尖周组织感染，这是根尖周炎最主要的感染途径。细菌进入牙本质小管的深度平均为0.25mm左右，在冠部侵入牙本质小管较深入，接近根尖部细菌侵入牙本质小管相对较浅。根尖周炎的不同时期细菌的检出情况有一定的差异。急性根尖周炎的主要检出微生物是牙髓卟啉单胞菌、齿垢密螺旋体、牙龈卟啉单胞菌等。慢性根尖周炎处于慢性过程，以厌氧菌为主的混合感染。

（二）通过牙周途径

根尖孔及侧支根管是牙髓和牙周组织联系的通道。这种由牙周途径引起的牙髓组织的感染称为逆行性感染，多见于老年人。年龄是牙周病的危险因素之一，牙周病的患病率和严重程度随着人年龄的增高而增重。深牙周袋中的细菌及其代谢产物可以通过根尖孔或侧支根管进入牙髓组织，或直接感染根尖周组织，导致牙髓、根尖周感染病变的发生。

引起牙髓、根尖周感染的细菌组成与深牙周袋中的细菌组成具有一定的相似性，常在感染根管、根尖周组织和深牙周袋内同时检出，多为厌氧菌，尤其以革兰阴性专性厌氧菌最多。牙龈卟啉单胞菌是牙周炎的主要致病菌，在感染根管内也常被检出。除此之外，也包括多种革兰阳性杆菌、球菌以及螺旋体。

当邻近根尖周组织的感染不断向周围蔓延，也会通过根尖孔或牙本质小管逆行性地波及到附近健康牙齿，造成邻牙的根尖周病变。

（三）通过血源感染

细菌及其代谢毒素可以通过血流循环进入牙髓，引起牙髓炎症，称为血源性感染，但临床上极为罕见。当牙髓发生代谢障碍或受创伤时，暂时性的菌血症可以引起细菌在牙髓中定植、增殖，这种现象称为“引菌作用”（anachoresis）或摄菌现象。临床上在进行一些口腔疾病的治疗过程中，如拔牙、牙周刮治、根管治疗等，可将病变局部的细菌挤压到血流中，出现一过性菌血症。正常人群，在机体防御系统作用下，很快能够清除血流中的细菌，而当机体防御功能减退时，进入血流的细菌不容易被清除掉，在机体的某些组织抵挡力薄弱的部位停留下来，造成感染。受创伤的牙髓发生退行性变，再被血行中的细菌感染，导致炎症、坏死；或者受了创伤的根尖周组织，引起感染，形成根尖周炎。

第三节　牙髓根尖周疾病的微生态致病学说

目前认为牙髓根尖周疾病是一类微生物感染所引起的疾病，但是对于引起牙髓根尖周疾病的病原菌是多种细菌所引起或是由某种特异细菌单独所引起，存在争论。

一、非特异性致病菌学说

细菌是引起牙髓根尖周疾病发生的根本原因。早在1890年口腔微生物学鼻祖Miller首次在人的坏死牙髓组织中发现细菌。而直到20世纪50年代末，才有实验证明细菌在牙髓根尖周疾病中发挥着重要作用。1960年，Keyes发现无菌条件下饲养的动物不产生龋齿。Kakehashi等在1965年通过经典的无菌鼠动物实验，发现牙髓组织暴露在无菌动物口腔只

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

存在轻度炎症反应而不会发生严重炎症反应和牙髓坏死，而带菌动物不仅发生牙髓坏死，随着实验进程发生根尖周炎，首次证实了细菌是牙髓根尖周组织感染的启动因子。动物实验显示，即使牙髓组织坏死，如果没有细菌的感染，也不会引起根尖周组织的破坏而发生根尖周炎。此后，实验室动物模型研究和临床实验研究，在病变的动物或人牙髓根尖周组织均可分离培养出微生物。抗生素等抑制或杀灭微生物的治疗手段可以减轻牙髓根尖周炎症的严重程度，进一步揭示微生物与牙髓根尖周疾病间的密切关系。

正常生理情况下，釉质或者牙骨质作为物理屏障保护牙髓和牙本质组成的功能性复合体，免于口腔内的外源性刺激损伤牙髓组织。健康的牙周组织阻止口腔内微生物沿着牙周组织到达根管开口进入牙髓组织或到达根尖周组织。一旦这些屏障遭到破坏，微生物即可进入牙髓组织和根尖周组织，引发感染病变。

随着现代微生物厌氧培养技术和分子检测手段的发展，由慢性根尖周炎患牙的感染根管内及根尖周组织中检测出的感染微生物更加复杂和全面。研究发现，感染根管内通常存在 1～12 种菌种，每克感染牙髓组织中微生物的数量从少于 10^2 至大于 10^8 不等。面对定植如此多种微生物，谁是主要致病菌，目前没有一个明确的定论。但是，与口腔内微生物群相比，进入牙髓根尖周系统的微生物，不同的生态环境和不同的疾病临床表现，其微生物构成具有一定的特点。

1. 以专性厌氧菌为主的混合菌感染是牙髓根尖周组织最常见的感染类型。革兰阴性专性厌氧菌占 90%。通常包括有梭杆菌属、卟啉单胞菌属、普雷沃菌属、优杆菌属以及消化链球菌。

2. 细菌类型与感染途径和病灶位的差异有关。具核梭杆菌（*Fusobacterium nucleatum*，*F. nucleatum*）为感染根管根尖 1/3 的优势菌群之一。人类巨细胞病毒和 EB 病毒通常在根管及髓腔完全钙化的慢性根尖周炎组织中检出。

3. 致龋菌和牙周病原菌与牙髓和根尖周组织感染有关。牙周病变时，深牙周袋中的细菌可以直接感染根尖周组织，或经根尖孔或侧支根管、副根管进入牙髓，导致继发于牙周感染的根尖周病变。研究发现感染根管中检出的病原菌同活动性牙周炎患者的牙周袋中病原菌十分相似。

牙周致病菌-牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*，*P. gingivalis*）除定植在口腔环境中的牙周袋内，在感染根管内常被检出（检出率为 46%～72%），与根尖周炎症状相关。作者研究表明，在有症状和无症状慢性根尖周炎的患牙中，牙龈卟啉单胞菌的不同基因型菌株分布存在不同，有症状的患牙根管检出以 *fimA* 基因Ⅱ型和Ⅳ型为主，而无症状的患牙根管检出以基因Ⅰ型为主。这与该菌在牙周炎患牙病变区的分布存在一定的相似性。

4. 根尖周炎多为牙髓病的继发感染。牙髓感染微生物可通过根尖孔、侧支根管、根尖分歧、副根管进入根尖周组织，导致组织损伤。引起根尖周炎绝大多数的微生物及其致病因子来源于定值在根管系统内的微生物群。

5. 细菌种类与临床症状有关。产黑色素的革兰阴性厌氧杆菌、梭杆菌和厌氧消化链球菌（*Peptostreptococcus anaerobius*，*P. anaerobius*）与根尖部疼痛、肿胀、黑色分泌物、恶臭和瘘管形成有关。作者发现福赛斯坦纳菌与慢性根尖周炎急性发作症状疼痛、叩痛、肿胀有关。放线菌感染与难治性根尖周病变和瘘道经久不愈有关，广泛性根尖周病变与厌氧菌感染有关。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

6. 初次根管治疗与再治疗时根管系统内细菌类型存在差异。在首次根管治疗病例中，由近似相等的革兰阳性和阴性菌组成，以可发酵氨基酸和蛋白质的专性厌氧菌为主。在根管再治疗的病例中，革兰阳性菌更为明显。粪肠球菌是难治性根尖周炎根管内的主要致病菌。白假丝酵母菌也可能与根管的再感染有关。

二、根管内、根尖区生物膜

生物膜(biofilm)是由微生物群落(细菌、真菌和原生动物)产生多聚糖覆盖于自身表面而形成的一个具有三维立体空间结构的微生态系统，存在于无活性的物体表面或黏附于生活组织表面。在生物膜中，细菌或相互黏附，或与接触界面粘接。生物膜为细菌提供了稳定的生存环境，有利于抵御外界不利因素，并增强其致病性。既然感染根管内定植着多种微生物，根管壁牙本质为这些细菌的黏附定植、生长繁殖形成生物膜提供了良好的生态环境。

(一) 口腔生物膜的形成特点

一般情况下，口腔环境中的生物膜的形成是一个动态发展过程，细菌通过自身合成的水合多聚物黏附在固体表面，以固着的方式生长从而形成生物膜。细菌生物膜的形成涉及几个明显的阶段，包括起始的附着、细胞与细胞之间的吸附与增殖、生物膜的成熟及最后细菌的脱离等四个阶段。

1. 生物膜的初始形成期　一些无机和有机分子沉积于宿主组织表面，形成一层无结构、无细胞的薄膜，称为获得性膜，其主要成分是来自于唾液和龈沟液的唾液蛋白或糖蛋白。结合牙根管壁的解剖特点，应首先是侵入根管，处于浮游状态，然后是与根管壁表面的胶原有机成分特异性结合或附着，然后产生介导其他微生物进入根管壁的细菌黏附于根管壁形成菌斑生物膜。

2. 生物膜的生长期　获得性膜形成后，口腔中定植的一些微生物通过特异性的识别机制与获得性膜中的特殊蛋白产生特异性结合黏附于获得性膜表面，唾液冲刷不能将其去除，同时黏附的微生物通过合成多聚体产物形成生物膜的基质，介导口腔内的浮游生物定植其中，丰富生物膜微生物种群的多样性，构建牙菌斑生物膜的三维立体结构，促使牙菌斑生物膜的成熟。因此，少数早期定制的细菌与宿主组织表面高度选择性结合，为后期菌的附着提供表面。最初附着的细菌是链球菌，随后是革兰阳性、革兰阴性细菌。当浮游细菌首先黏附到宿主表面时，单个附着细菌仅由少量胞外聚合物包裹，菌体还可以重新进入浮游状态，这种情况下黏附是可逆的。

生物膜的生长黏附包括3个阶段：

第一阶段：细菌与底物间的黏附，通常借助于鞭毛、菌毛、胞外多糖。

第二阶段：细菌与底物间形成连接桥，连接桥为静电引力、共价氢键力以及偶极相互作用共同形成的。这种连接力比较弱。

第三阶段：多糖物质或配体的结合使得细菌与底物间的连接力变得更牢固。

3. 生物膜的成熟期　生物膜内的细菌进一步生长与繁殖，细菌种类逐渐增多，菌斑大小和厚度增加，厌氧菌、能动菌和螺旋体(如弯曲菌、密螺旋体)等比例上升。胞外聚合物粘结细菌而形成细菌团块，称为微菌落。微菌落是生物膜的基本结构单位，类似蘑菇状或锥状，呈水平和垂直方向的排列，在这些菌落之间有输水通道来运送营养物质、酶、代谢产物

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

等。成熟生物膜的镜下观察呈三维立体的玉米棒结构。

4. 生物膜的播散期　成熟生物膜通过蔓延，部分脱落或释放出浮游细菌等方式进行扩展，从生物膜中脱落出来的细菌重新成为浮游细菌，在完成生物膜发展的一个循环同时，启动下一个生物膜的形成。目前认为生物膜的播散是细菌在营养和空间受到限制时的主动适应性改变。生物膜的播散有三种形式：群游播散、团块播散和表面播散。其调控机制目前仍不清楚。

口腔生物膜为多菌种生物膜，不同菌种在不同的时间和空间发展，存在着菌种的交替演变。生物膜中早期定植的链球菌和放线菌的代谢造成氧化还原电位和 pH 的改变形成厌氧微环境，使得厌氧菌占主导地位。在生物膜成熟过程中，细菌的密度感应系统（quorum sensing，QS）起着非常重要的作用，细菌通过其来监测群体的细胞密度来调节特定的基因表达，保证生物膜中营养物质的运输和代谢物的排除，避免细菌过度生长而造成空间和营养物质的缺乏。

（二）根管生物膜

牙髓根尖周疾病感染微生物在感染根管内牙本质面，根尖牙骨质面主要是以细菌生物膜的方式定植，附着在根管内壁的生物膜称为根管生物膜。根管生物膜内的微生物不仅黏附在根管壁上，而且侵入牙本质小管、侧支根管、根尖分支、根管峡部，使生物膜在根管壁表面形成钉突状结构镶嵌于牙本质壁上，同时也可以隐匿于根尖牙骨质吸收腔隙中。因其特殊的微生态环境，临床治疗中不易被清除，导致牙髓感染性疾病经久不愈、根管治疗失败。

根管生物膜的细菌主要来自口腔环境。复杂的根管解剖结构为细菌提供了良好的生长场所。长期暴露的坏死牙髓或者根管治疗失败后导致根管感染是根管生物膜形成的前提。牙髓炎炎性渗出物为生物膜形成提供了液体环境，有利于细菌侵入根管内定植，黏附于根管壁形成生物膜。而根管系统内牙髓组织脆弱的血液循环，一旦牙髓坏死，则整个根管内缺乏血供，定植在根管系统内的微生物失去宿主免疫防御系统的攻击，该环境为微生物的定植和生长提供了良好的生态环境。

Nair PN 早在 1987 年通过透射电镜观察根尖周炎感染根管，首次确定了感染根管内微生物形成生物膜的形态。细菌在根管壁形成致命的聚集层，其排列类似于牙菌斑的栅栏状结构。根管生物膜的细菌组成与根管内营养条件、pH 值等因素相关。根管生物膜中存在多种细菌，每种细菌在生物膜中都起着特定作用，以维持生物膜生态系统的稳定，有助于细菌更好地适应周围的生态环境。未经治疗的感染根管中主要为专性厌氧菌，包括梭杆菌、普氏菌、放线菌、链球菌、密螺旋体等。根管治疗失败后检出的根管生物膜细菌主要是革兰阳性菌，其常见有粪肠球菌、假丝酵母菌。

（三）根尖生物膜

存在于根管根尖段末端以及根尖牙骨质表面和超填牙胶尖表面的生物膜称为根尖生物膜。根尖生物膜与难治性根尖周炎密切相关。根尖生物膜分为游离状态的生物膜和附着状态生物膜。

游离状态的生物膜是指位于根管根尖末端且与根尖周组织直接接触的生物膜，其不附着于固体表面，存在于软组织的表面，对根尖周组织的危害性强。当细菌在根管内的生长环境和营养不良时，根尖周组织的渗出液进入到根管的根尖段，定植于根管壁上生物膜内的微生物能够利用渗出液中的营养成分进行生长繁殖，细菌生物膜顺着根尖孔周围的牙本质和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

牙骨质不断扩展，越过根尖孔到达根外的牙骨质表面，形成根尖外生物膜，或根尖生物膜在根管未感染的情况下通过根周的牙周袋内生物膜扩展至根尖外形成生物膜。此型生物膜称为附着性生物膜。

根尖外生物膜不仅能够抵御宿主的防御反应，而且目前临床上牙髓根尖周疾病的非外科手术治疗方法也无法清除这些致病性的生物膜。临床上有时出现难治性根尖周炎的病例，此时可采用外科手术方法清除根尖外生物膜，达到治愈患牙的目的。

根尖生物膜的微生物组成多为专性厌氧菌和兼性厌氧菌，最常分离的专性厌氧菌是普氏菌、微小消化链球菌和坏死梭杆菌，也可分离出轻链球菌。根尖生物膜可由单一菌种组成，也可由多种细菌组成。根尖生物膜中放线菌属也与根尖周炎密切相关。放线放线杆菌在组织内呈色黄颗粒，似"硫黄颗粒"，系由菌丝缠结而成。放线杆菌在生物膜中的聚集受pH值、离子梯度和细菌浓度影响。放线放线杆菌的聚集也促进了生物膜的形成。

成熟的根尖生物膜在环境因素的诱导下释放部分浮游菌，这些浮游菌可引起慢性感染的急性发作，也可游走到周围的其他部位，重新进行黏附、繁殖，形成新的生物膜。

根管内和根尖区生物膜的致密结构形成扩散屏障，常规应用抗生素只能杀灭生物膜释放的浮游菌，缓解临床症状，而位于生物膜深层的细菌则免受影响；根管冲洗液单纯机械冲刷也难以将其去除。根尖生物膜细菌为适应不利外界环境，通过相互基因交换进行信息传递形成自我保护的共生状态，抵抗机体的免疫作用。根管和根尖区生物膜的这些特性，增强细菌的毒力和致病力，成为难治性慢性根尖周炎疗效欠佳、经久不愈的根源，为临床根管治疗、根管再治疗带来难点和挑战。

三、宿主与致病菌间的平衡学说

口腔微生物种类繁多，约有11个菌属的700个菌种或基因型的细菌，主要为微需氧菌、兼性厌氧菌和厌氧菌。口腔菌群划归为固有菌群（indigenous flora）、增补菌群（supplemental flora）和暂时菌群（transient flora）三种类型。包含以高数量（大于1%）存在于某个特殊部位的固有菌群与宿主呈稳定的相互关系。常居的，但是以低数量（少于1%）存在的增补菌属在环境改变时可以成为固有菌。暂时菌群由非致病菌或条件致病菌所组成，来自周围环境或宿主其他生境，可在皮肤或黏膜上存留数小时、数天或数周。如果宿主免疫功能受损或固有菌群发生紊乱，可在体内定植、繁殖和引起疾病。菌群组成和变化的多样性决定了口腔微生态的平衡与失调，决定着口腔疾病的发生与发展。

口腔正常菌群之间与宿主之间的相互作用是动态平衡的。生理情况下，口腔正常菌群，对构成微生态平衡（microeubiosis）和保持内环境稳定起到重要作用，包括作为生物屏障，抑制外源性微生物；维持口腔微生物生态平衡；刺激宿主产生免疫应答；参与宿主的物质代谢、营养转化和合成。但在环境中的某些因素干扰了菌群与宿主之间的平衡状态，导致菌群失调，正常菌群中原无致病性的或毒力很弱的细菌，成为机会致病菌而引起内源性感染疾病。

（一）致病菌之间的相互作用

细菌在生物膜中不是单独孤立存在的，细菌之间存在着复杂的相互作用。牙髓根尖周微生物与体内其他微生态系微生物一样，可能发生不同的相互影响作用，如营养竞争、生存的协同作用、拮抗作用、毒力因子的中和作用、生长依靠信号机制干扰等。牙龈卟啉单胞菌常与中间普氏菌、具核梭杆菌、福赛斯坦纳菌及齿垢密螺旋体（*T. denticola*，*T. d*）共存。研究

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

证实牙龈卟啉单胞菌和齿垢密螺旋体的营养共生。慢性根尖周炎感染根管中,牙龈卟啉单胞菌和福赛斯坦纳菌呈正相关定植。变黑普氏菌产生的细菌素(bacteriocin),对牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌、福赛斯坦纳菌及放线菌属均具有杀菌作用。细菌彼此间通过密度感应来进行信号传递,分泌和感应自身诱导分子(autoinducer,AI)感知并调控自身周围环境中细菌的密度,同时激活细菌相关基因的表达,调控细菌毒力因子、抗药性、生物膜形成等菌群生物学行为。

(二) 致病菌与宿主之间的相互作用

上皮细胞暴露于生物膜中,是抵御细菌及其毒力因子侵袭口腔宿主细胞的重要物理屏障,同时能通过细胞表面的受体感应和应答细菌的入侵,分泌抗菌肽、蛋白酶、细胞因子等,以维持微生态的平衡。

牙龈卟啉单胞菌可通过特异性黏附素与上皮细胞相应受体结合,激活宿主信号转导系统,引发肌动蛋白细胞骨架重排,便利细菌入侵细胞质,最终内化于宿主细胞。牙龈卟啉单胞菌入侵激活宿主细胞固有免疫应答,抑制上皮细胞表达 IL-8,抑制机体免疫防御入侵细菌的能力。齿垢密螺旋体不能直接入侵上皮活细胞,但可黏附成纤维细胞、上皮细胞,其主要外膜蛋白(major surface protein,MSP)对宿主细胞产生细胞毒性作用,引发细胞病变;其成孔作用可能参与革兰阴性细菌感染骨组织的骨吸收的调控。

口腔致病菌与宿主细胞之间存在着错综复杂的相互作用关系。牙髓根尖周正常菌群之间与宿主之间的相互作用,在正常情况下呈动态的平衡状态。当微生态中微生物之间、微生物与宿主之间保持动态平衡时,宿主健康无疾病。当正常菌群失去相互制约,或微生物和宿主之间失去平衡、宿主抵抗力下降时,致病菌增多,都可引起疾病。

牙髓根尖周病的发生发展,可以视为宿主与微生物相互作用的稳态破坏的直接或间接结果。

四、微生物的致病机制

微生物侵入宿主能否引起感染和疾病,主要取决于微生物的毒力强弱、侵入机体的数量和侵入部位以及宿主免疫力强弱。微生物感染入侵引起疾病,通常需要:①黏附并定植于宿主细胞、组织;②适应宿主特定环境进行增殖,并向其他部位侵袭或扩散;③抵抗或逃避机体的免疫防御机制;④释放毒素或诱发超敏反应,直接或间接引起组织损伤。

牙髓根尖周病为细菌感染性疾病。当感染微生物入侵和定植于根管系统,坏死牙髓成为混合菌(主要以厌氧菌为优势菌)的生态环境,这有利于细菌微生物形成生物膜,附着于根管壁。同时,定植于感染根管的细菌可通过根尖孔、侧支根管进入根尖周组织,引起根尖周组织损伤。

入侵的细菌及其毒力因子可产生多种有害物质,直接毒害宿主细胞或结缔组织细胞间质,这些分泌物质主要是各种酶、外毒素和代谢产物。此外,细菌结构成分包括肽聚糖(peptidoglycan,PGN)、脂磷壁酸(lipoteichoic acid)、菌毛(fimbriae)、鞭毛(flagella)、外膜蛋白和囊泡(outer membrane proteins and vesicles)、细菌 DNA、胞外多糖(exopolysaccharides)和内毒素(lipopolysaccharide,LPS)等通过引发机体的防御应答导致组织损伤(表 11-1)。

(一) 微生物的结构毒力因子

1. 内毒素　内毒素(lipopolysaccharide,LPS)是革兰阴性细菌细胞中的脂多糖。LPS 是

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

由菌体特异性多糖、非特异性核心多糖和脂质 A 三部分构成，脂质 A 是内毒素的主要毒性组分。作为低分子物质，LPS 较细菌更易渗透进入根尖周组织。

LPS 是根尖周病主要致炎因子之一，与牙髓根尖周病临床症状以及根尖骨吸收程度密切相关。LPS 与宿主细胞的结合依赖于宿主细胞的 LPS 结合蛋白(LPS-binding protein, LBP)和 CD14。LPS 和 LBP 形成 LPS-LBP 复合物后，再与 CD14 结合。作为 CD14 的信号分子的 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)同时为 LPS 识别受体，介导 LPS 信号的跨膜转导，激活核转录因子 kB(nuclear factor kappa, NF-kB)，启动细胞因子表达，引发炎症反应。

LPS 参与诱导根尖周病的致病机制主要通过活化单核/巨噬细胞，合成释放促炎症因子(IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α)、前列腺素(prostaglandins)、一氧化氮(nitric oxide, NO)以及氧自由基(oxygen-derived free radicals)，引发疼痛、发热反应。或直接经旁路过度活化补体系统。趋化吞噬细胞向炎症部位聚集，增加血管通透性。激活接触因子(Hageman factor)，启动内源性凝血途径，产生缓激肽，加重疼痛症状。LPS 可以介导白细胞与血管内皮细胞的黏附，加重组织细胞损伤。刺激破骨细胞分化和诱导骨吸收。LPS 通过 TLR4 介导成骨细胞表达 RANKL，刺激分泌 IL-1、IL-6、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)以及 TNF-α 等促进破骨细胞分化因子。LPS 直接激活 B 细胞，引发特异抗体合成，介导体液免疫反应。同时激活 TLR4/CD14，产生神经肽，引发中枢神经疼痛传导。研究证实三叉神经元表达 TLR4/CD14 受体，LPS 作用感觉纤维，激活 TLR4/CD14，诱导胞内信号转导。

2. 肽聚糖　肽聚糖(peptidoglycan, PGN)是细菌细胞壁的主要成分，通过旁路活化补体系统，激活单核/巨噬细胞，表达 IL-1β、IL-6、TNF-α、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)，在根尖周病损进展中发挥重要作用。跨膜受体 TLR2、胞质受体 NLR(主要是 Nod-1、Nod-2 和 Nalp-3)以及肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition protein, PGRP)能识别肽聚糖，参与固有免疫应答诱导炎症反应和细胞凋亡。

3. 脂磷壁酸　脂磷壁酸(Lipoteichoic acid, LTA)是革兰阳性菌细胞壁的多糖成分，是革兰阳性菌的重要表面抗原。与革兰阴性菌 LPS 类似，LTA 可激活补体系统，诱导宿主细胞炎症反应，还具有介导菌体与宿主细胞的黏附、稳定和加强细胞壁等多重作用。LTA 通过宿主细胞的 TLR2 受体激活分泌炎症因子 IL-1β、IL-6、CXCL8 和 TNF-α，并参与转导根尖周骨破坏信号通路。

4. 外膜蛋白　外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)是细菌外膜的主要成分，不仅是细菌细胞与周围环境相互联系的重要通道，同时具有多种生物学活性。OMP 促进 B 淋巴细胞有丝分裂，刺激巨噬细胞和淋巴细胞产生促炎症和免疫调节因子 IL-1β、IL-4、IL-6、CXCL8、TNF-α、GM-CSF 和 IFN-γ。

5. 膜泡　膜泡(outer membrane vesicles, MVs)具有携带毒力因子的特性，被称作细菌炸弹(bacterial "bombs")。伴放线菌聚集杆菌、牙龈卟啉单胞菌的膜泡内包含毒素、蛋白酶、黏附素以及脂多糖等毒力因子，通过胞吞途径入侵上皮细胞，引起组织损伤，激发炎症反应。

6. 脂蛋白　脂蛋白(lipoproteins)多位于革兰阴性菌细胞壁，通过共价键连接外层膜和多糖。刺激巨噬细胞产生 IL-1β、IL-6、IL-12 和 TNF-α。

7. 菌毛　菌毛(fimbriae)作为大多数革兰阴性菌和少数革兰阳性菌表面结构之一，介导细菌与宿主组织之间相互作用，促进细菌对靶位点的黏附和定植。*FimA* 是特异的牙龈卟啉

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

单胞菌菌毛亚单位蛋白基因，不同 *fimA* 基因型的牙龈卟啉单胞菌分布与根尖周炎的临床症状相关。

8. 胞外多糖　胞外多糖（exopolysaccharides，EPS）为细菌黏附宿主细胞表面提供便利；为生物膜的结构成分，为细菌聚集生长提供营养支持。EPS 可诱导免疫细胞表达 IL-1β、IL-6、CXCL8、TNF-α，激发炎症反应。

9. 鞭毛　鞭毛（flagella）是细菌的运动器官，运动特性具有化学趋向性，能逃避吞噬作用，增强细菌对宿主的侵害。TLR5 能识别鞭毛蛋白，激活宿主免疫应答，表达炎症因子。

10. 细菌 DNA　细菌 DNA 能直接刺激巨噬细胞和树突状细胞表达炎症因子。研究证实细菌 DNA 中含有一些具有免疫学活性的短核苷酸序列，其特征结构为未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸（CpG）。固有免疫系统通过识别 CpG 特征结构来识别细菌 DNA 并产生免疫应答。

（二）微生物的分泌物质

1. 酶　致病菌分泌的蛋白酶、纤维蛋白溶酶、胶原酶、硫酸软骨素酶、透明质酸酶等导致组织损伤，感染扩散，加剧炎症反应。如蛋白酶、纤维蛋白溶酶降解宿主细胞蛋白质；胶原酶、硫酸软骨素酶等可致组织崩解；环氧合酶-2（COX-2）的产物 PGE2，可引起局部组织水肿。

2. 外毒素　白细胞毒素（leukotoxin，Ltx）可对中性粒细胞、单核细胞产生特异性毒性作用，是与牙髓感染相关的直肠弯曲菌（*Campylobacter rectus*）毒力因子之一。

3. 热休克蛋白　热休克蛋白（heat-shock proteins，HSPs）能引起机体的细胞和体液免疫，杀灭病原微生物的同时介导免疫应答。牙龈卟啉单胞菌（*P. gingivalis*）产生的 HSPs 可表现为骨吸收活性，引起根尖周骨组织的破坏。

4. 代谢产物　细菌在生长过程中释放的分解代谢产物，如氨、硫化氢、吲哚和有机酸等，能直接毒害细胞导致组织损伤，或通过诱导宿主免疫应答间接造成组织损伤。

（三）微生物的数量

感染的发生，微生物必须具有一定的毒力外，还需有足够的数量。菌量的多少，一方面与微生物毒力强弱有关，另一方面取决于宿主免疫力的高低。一般是微生物毒力愈强，宿主免疫力越低，引起感染所需的菌量愈小。

（四）微生物的侵入部位

各种致病菌具有特定的侵入部位，这与其生长繁殖所需特定的微环境有关。

由于微生物结构、代谢产物、毒力因子、生长繁殖所需条件以及侵入和定植部位的不同，各种细菌的致病性有很大的差异。

（五）微生物的生长状态

微生物以浮游和生物膜两种生长状态存在，不同生长状态细菌的生物学特征存在差异，其致病能力也存在差异。

牙髓根尖周病根据发病情况分为急性和慢性根尖周炎。急性感染通常由高毒力菌种、菌株或它们的协同作用所致。当细菌呈生物膜表型，代谢率较低，一些酶和毒素基因信号转导处于休眠状态；当浮游细菌从生物膜中释放，能激活毒力因子的基因编码高度表达，细菌侵袭力和毒力增强。所以，当细菌处于浮游状态时常常导致急性感染或慢性感染的急性发作。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

生物被膜状态的细菌引发慢性感染。慢性感染通常与低毒力菌群对宿主的持续刺激相关。慢性根尖周炎感染根管中的细菌在根管壁形成生物膜,持续刺激根尖周组织,引发炎症反应。生物膜中细菌通过密度感应进行信号传递形成自我保护的共生模式,抵抗机体防御作用;生物膜对机体免疫系统的防御抵抗又会加速浮游细菌、代谢产物以及免疫复合物的播散,导致根尖周慢性感染急性发作,引起病情反复,根尖周病变迁延不愈。

表 11-1　牙髓主要微生物与可疑毒力因子

微生物	牙髓感染类型	可疑毒力因子
牙髓卟啉单胞菌 *Porphyromonas endodontalis*	原发	脂多糖、荚膜、外膜蛋白、蛋白酶、膜泡、酸性磷酸酶、代谢酸
牙龈卟啉单胞菌 *Porphyromonas gingivalis*	原发	脂多糖、菌毛、荚膜、脂蛋白、膜泡、蛋白酶、纤溶酶、磷脂酶、酸性磷酸酶、透明质酸酶、软骨素硫酸酯酶、溶血素、代谢分子、热休克蛋白
福赛斯坦纳菌 *Tannerella forsythia*	原发	脂多糖、胰蛋白酶样酶、酸性磷酸(酯)酶、代谢分子、凋亡诱导因子、热休克蛋白
中间普氏菌 *Prevotella intermedia*	原发	脂多糖、菌毛、代谢分子、蛋白酶、溶血素、酸性磷酸酶、磷脂酶、热休克蛋白
具核梭杆菌 *Fusobacterium nucleatum*	原发	脂多糖、外膜蛋白、荚膜、代谢分子、热休克蛋白
微单胞菌 *Parvimonas micra*	原发	肽酶、透明质酸酶、荚膜、硫化氢
直肠弯曲菌 *Campylobacter rectus*	原发	胞外毒素、脂多糖、S 层芳基硫酸酯酶、硫化氢、热休克蛋白
咽峡炎链球菌群 Streptococcus anginosus group	原发/持续/继发	肽聚糖、脂磷壁酸、酶、代谢分子
粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*	持续/继发	脂磷壁酸、明胶酶、透明质酸酶、溶细胞素、聚合物、外激素、热休克蛋白
假丝酵母菌 *Candida albicans*	持续/继发	甘露聚糖、磷脂酶、蛋白酶、透明质酸酶、酸性磷酸酶、软骨素硫酸酯酶、磷脂酶、热休克蛋白

五、宿主对感染微生物的防御机制

随着宿主组织对感染微生物的识别机制及其免疫机制研究的进展,认为牙髓根尖周病是机体对髓腔内刺激物质的免疫应答在牙髓根尖周组织的局部表现。牙髓根尖周病的发生、发展、转归与其局部免疫应答密切相关。

牙髓根尖周病变的发生、发展及其转化,取决于细菌性感染和宿主抗感染两方面斗争的结果。细菌除通过直接作用破坏机体组织外,主要诱发产生免疫反应。其机制是致病菌感染牙髓根尖周细胞后,激活宿主的类型识别受体,实现对外来病原体的早期识别,进而启动固有免疫(innate immunity)的效应机制,实现细胞吞噬,炎性介质包括细胞因子及趋化因子的合成和分泌,上调抗原呈递细胞表面共刺激分子的表达,诱导 T 或 B 淋巴细胞向效应 T 或

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

B 细胞分化，最终强化适应性免疫(adaptive immunity)。

宿主防御感染微生物的能力，与宿主细胞、细胞间介质、代谢产物、效应分子、体液抗体相关。在感染和免疫过程中，各免疫器官、组织、细胞和分子间相互协作、相互制约、密切配合，共同完成复杂的免疫防御功能。

(一) 细胞成分

参与宿主防御的细胞主要包括多形核白细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMN)、淋巴细胞(lymphocytes)、浆细胞(plasma cells)、单核/巨噬细胞(monocyte/macrophages)、成纤维细胞(fibroblasts)、成骨细胞(osteoblasts)以及上皮剩余细胞。

1. 多形核中性粒细胞　PMN 胞质颗粒中酶的释放，可导致组织细胞和胞外基质的结构的降解，根尖周病急性期发生的组织崩解，其原因之一就是由于大量中性粒细胞的聚集。

2. 淋巴细胞　主要包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和自然杀伤细胞(natural killer cells, NK)。T 淋巴细胞产生细胞免疫应答，其效应形式主要有两种：与宿主细胞特异性结合，破坏宿主细胞膜，直接杀伤细胞；NK 可以释放淋巴因子，使免疫效应扩大和增强。B 淋巴细胞介导体液免疫。大多数抗原物质在刺激 B 细胞形成抗体过程中，需 T 细胞的协助。在某些情况下，T 细胞亦有抑制 B 细胞的作用。不论是细胞免疫还是体液免液，共同构成了一个极为精细、复杂而完善的防御体系。

3. 巨噬细胞　是单核-吞噬细胞系统中主要的抗原呈递细胞。病原微生物侵入机体后，在激发免疫应答以前即可被巨噬细胞吞噬并清除。巨噬细胞参与免疫效应、免疫调节。其在免疫应答中分泌的 IL-1、TNF-α、干扰素、生长因子在根尖周炎中起重要作用。

(二) 免疫防御机制

固有免疫与适应性免疫是生物体防御外界微生物入侵的两大重要防御机制(表 11-2)。在防御入侵微生物时，它们互相配合、协同作战。其中，固有免疫系统是生物体赖以生存的最基本条件，是抵御微生物入侵的第一道屏障。单核细胞、巨噬细胞以及内皮细胞等的激活是引导宿主级联反应重要的初始步骤。宿主细胞的类型识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)对致病微生物相关分子类型(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的识别(recognition)和感应(sensing)，启动宿主细胞固有免疫反应，对诱导宿主的炎症反应和微生物的杀灭及清除起到重要作用。

表 11-2　固有免疫与适应性免疫

	适应性免疫	固有免疫
效应细胞	T 细胞、B 细胞	巨噬细胞、自然杀伤细胞、内皮细胞、成纤维细胞
效应因子	抗体、T 细胞	细胞因子
机制	外周或中央 T 细胞耐受缺陷	识别受体激活

跨膜 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)和胞质 NOD 样受体(NOD-like receptors, NLRs)被认为是两类最重要的类型识别受体。迄今为止，已发现 11 种 TLRs 和 22 种 NLRs，不同的类型识别受体识别不同的 PAMP，而某些 PRRs 可协同作用以识别某一特殊病原体的 PAMPs 复合物(表 11-3)。感染微生物入侵宿主细胞，TLRs 和 NLRs 能够特异性与相应 PAMPs 结合，启动信号转导通路，引起 NF-kappaB 转录因子的激活，调控细胞因子的表达，介

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

导早期的固有免疫应答，以清除入侵微生物。

表 11-3　固有免疫中的类型识别受体与致病微生物相关分子类型

类型识别受体	致病微生物相关分子类型
TLR1	细菌脂蛋白
TLR2	细菌肽聚糖、革兰阴性菌脂蛋白、革兰阳性菌脂磷壁酸、病毒结构蛋白、真菌酵母多糖、*Porphyromonas gingivalis* 和 *Leptospira interrogans* 脂多糖
TLR3	病毒双链 RNA(dsRNA)
TLR4	大多数革兰阴性菌脂多糖、病毒结构蛋白
TLR5	细菌鞭毛蛋白
TLR6	真菌酵母多糖
TLR7	病毒单链 RNA(ssRNA)
TLR8	病毒单链 RNA(ssRNA)
TLR9	细菌或病毒含 CpG 基序的 DNA 片段
NOD1	革兰阴性菌肽聚糖
NOD2	细菌肽聚糖
NLRP1	胞壁酰二肽(MDP)
NLRP3	胞壁酰二肽(MDP)、壳聚糖、病毒双链 RNA(dsRNA)
NLRC4	细菌鞭毛蛋白
NAIP	细菌鞭毛蛋白
LBP	革兰阴性菌脂多糖
CD14	革兰阴性菌脂多糖
甘露糖受体 mannose receptor, MR	微生物表面的甘露聚糖或岩藻糖样结构
清道夫受体 scavenger receptor, SR	细菌糖蛋白或糖脂成分，革兰阴性菌脂多糖、革兰阳性菌脂磷壁酸

牙髓根尖成纤维细胞作为牙髓根尖周组织中最广泛的非专职抗原呈递细胞能够通过类型识别受体识别感染细菌和启动牙髓根尖周组织的固有免疫反应，成为牙髓根尖周组织抵抗外界微生物侵袭的第一道防线。牙髓根尖周宿主细胞在受到病原菌感染时，TLRs 和 NLR 交叉对话，相互协同，互相拮抗，激活宿主固有免疫应答，调控牙髓根尖周炎症反应的发生发展，并可启动适应性免疫应答。

当微生物突破宿主固有免疫防线，就有可能产生感染性疾病，并诱发适应性免疫应答。适应性免疫是个体出生后，在生活过程中与感染微生物及其毒力因子等抗原分子接触后产生的，或通过人工免疫而获得的一系列免疫防御功能，担负宿主免疫防御“第二道防线”作用。

适应性免疫可分为黏膜免疫(mucosal immunity)、体液免疫(humoral immunity 或 antibody-mediated immunity)和细胞免疫(cell-mediated immunity)。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

黏膜免疫和体液免疫是抗胞外菌感染的主要适应性免疫机制，通过增强吞噬作用、阻断致病菌黏附和定植、中和外毒素、激活补体等作用来发挥防御作用。T细胞介导的细胞免疫，可活化巨噬细胞释放IFN-γ、IL-1、TNF-α等炎性因子，激活迟发型超敏反应，以清除胞内菌。

固有免疫和适应性免疫相辅相成、密不可分。固有免疫往往是适应性免疫的先决条件，为适应性免疫应答的识别准备了条件。适应性免疫应答的效应分子可大大促进固有免疫应答。固有免疫和适应性免疫共同作用，提供了一个更复杂、更完整的抵御入侵微生物的免疫防御机制。

第四节　牙髓根尖周疾病的微生态系统

牙髓一旦坏死，根管系统则成为细菌群落及其副产物、坏死牙髓组织降解产物的"特权庇护所"。根管系统是一个选择性培养基，偏向某些特定的细菌种属的生长。组织液以及坏死牙髓的分解产物提供了丰富的营养，包括氨基酸和多肽等。这些营养以及低的氧应力和细菌副产物决定了哪些细菌更受青睐。与唾液中的微生物相比，感染根管系统内的细菌组群有所限制。绝大多数感染牙髓内的细菌为专性厌氧菌。这些细菌仅在无氧条件下生存，但对氧的敏感性并不一致。

多种微生物的相互作用和相应的营养需求使得很难对所有与牙髓感染有关的微生物进行培养和鉴定。直至1970年之前，由于厌氧培养方法的不足，仅少数严格厌氧菌被分离和确定。随着厌氧培养技术以及选择性和非选择性培养基的使用，厌氧菌在牙髓和根尖周病病理中的重要地位才凸显出来。目前认为，原发性根管感染的微生态特点是多种微生物共同存在，优势菌是革兰阴性杆菌。然而，即使采用最先进的培养方法，仍然有许多微生物难以培养。

一、原发性根管感染的微生态

原发性根管感染的微生物来源主要是龋病。龋病是细菌及其副产物进入牙髓腔最常见的入侵门户，细菌入侵并在牙本质小管内繁殖，进而造成髓腔及根管的感染。牙本质小管的直径一般在1～4μm，而大多数的细菌的直径则小于1μm，若釉质或牙骨质丧失，微生物可能直接通过暴露的牙本质小管入侵牙髓。成牙本质细胞突起溶解后的空的牙本质小管可能形成微生物通向牙髓的"高速公路"。

微生物可通过修复过程或创伤时以及牙齿的异常发育导致的牙髓直接暴露而到达牙髓。外伤导致的牙髓暴露、炎症、坏死以及细菌侵入，2周后细菌侵入牙髓不超过2mm。在牙髓未直接暴露的患牙也可能对牙髓产生直接效应。在邻近暴露的牙本质小管侧呈现炎症反应，尽管炎症反应可能导致牙髓坏死，但在大多数情况下牙髓则经历愈合和修复。

（一）细菌

感染根管内分离出的细菌与菌斑、牙周袋及龋损处分离出的细菌基本一致。在根尖区域主要为缓慢生长的专性厌氧菌，而在根管冠部主要为生长更加快速的兼性厌氧菌。年龄较大者牙本质小管内细菌的感染范围可能小于年轻者。常见的细菌种属包括革兰阳性球、杆菌以及革兰阴性球、杆菌。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

卟啉菌属和普雷沃菌属中产黑色素的细菌在牙髓病和牙周病中获得诸多关注。这些厌氧的革兰阴性杆菌在原发性感染根管内常常被分离出来，是原发性感染根管的优势菌，特别是变黑普雷沃菌、中间普雷沃菌、坦纳普氏菌、产黑色素普氏菌、栖牙普氏菌、口颊普氏菌以及卟啉菌属的牙髓卟啉单胞菌和牙龈卟啉单胞菌。牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和变黑普雷沃菌在原发性根管感染的检出率明显大于再治疗病例。变黑普氏菌能够在体外激活 pro-MMP-2 和 pro-MMP-9，而该通路的激活可能与根尖周组织的破坏有关。而牙龈卟啉单胞菌Ⅱ、Ⅳ及 *fimA* 基因型相较于Ⅰ型与临床症状（水肿、瘘道或根管内渗出）更相关。

福赛斯坦纳菌是一种革兰阴性厌氧杆菌，由于其极难培养，在早期研究中未曾在感染根管内检出。分子生物学技术证实其常可从感染根管内分离，并可同时发现牙龈卟啉菌和栖牙密螺旋体。

链球菌中最常见的是咽峡炎链球菌、中间链球菌、缓症链球菌、口腔链球菌、戈氏链球菌、血链球菌等。血链球菌及唾液链球菌常从根管内检出，这可能是由于唾液污染了根管所致。乳杆菌属通常存在于有龋病的牙齿。衣氏放线菌和其他放线菌也可能存在，有时还可出现放线菌病的根尖病损。

（二）真菌

白假丝酵母菌是感染根管内最常见的真菌（检出率 10% ~28%）。在根管暴露于口腔环境时，电镜下可观察到酵母菌，难治性根尖病损根充后的活检标本也可观察到。老年人 17% 的根管感染病例可能仅存在酵母菌或伴有其他细菌。原发性感染中，7% 的难治性病例可检出酵母菌，有时为纯培养，但多相伴有其他细菌。奶瓶龋导致的乳牙牙槽脓肿的患者，其病损处脓液中 40% 为酵母菌。

（三）螺旋体

螺旋体也是难于培养的微生物之一，在以往研究中并未强调。近年来，学者们采用分子学方法证实其可从初次感染的根管内分离。感染根管内最常见的密螺旋体为索氏密螺旋体和齿垢密螺旋体。在有症状的慢性根尖周炎中，恶臭密螺旋体的检出率较高（56%）。小密螺旋体在慢性根尖周炎中也有较高检出率（52%），急性根尖周炎中下降（20%），而在有脓肿形成的病例中则无检出。索氏密螺旋体在有症状的根尖周炎、急性根尖周炎及急性根尖周脓肿病例中检出率均较高。

（四）病毒

病毒参与构成原发性感染根管的微生态。在不可逆性牙髓炎和根尖周炎时，患者 EB 病毒（人类疱疹病毒）DNA 和 RNA 的总体百分率（43.9%、25.6%）明显高于健康牙髓（0%）。在原发性感染和再治疗病例中均有明显升高。疱疹病毒可存在于牙髓源性的蜂窝织炎及脓肿中，但并不是形成脓肿所必需的。

（五）感染根管内微生物的新种类

随着研究技术的进展，许多新的微生物从感染根管中检出并被识别。古细菌域（其是生物三域系统之一，是一类高度变化的原核生物，区别于细菌和真核生物）中的成员如口腔甲烷短杆菌样种系型（*Methanobrevivacter oralis*-like phylotype）可从感染根管内检出。古细菌在原发性根管感染检出率（38%）高于再治疗病例（17%）。在急性根尖周炎病例中，60% 的感染根管内可检出非乳解假分枝杆菌，害肺小杆菌检出率与其近似，两者仅存在于无症状根尖

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

周炎的根管感染中。急性根尖周炎患者根管内还可检出较多龈沟产线菌(30%),从有脓肿形成的牙齿吸出的脓液中可检出更多(42.1%)疾卡菌和毗邻颗粒链菌是牙髓感染中所发现的新种属,在原发性感染根管内具有一定的检出率(分别为26%、14%)。拟杆菌门克隆X083(*Bacteroidetes clone X083*)、保氏普雷沃菌、嗜糖普雷沃菌(*Prevotella multisaccharivorax*)等也是新近发现的与原发性根管感染有关的病原菌(50%、35%、25%)。

原发性感染根管的微生物种类见表11-4。

表11-4 原发性感染根管的微生物种类

兼性厌氧菌	厌氧菌	兼性厌氧菌	厌氧菌
革兰阳性球菌		假单胞菌属	普雷沃菌属
球菌属	微单胞菌属	艾肯菌属	梭杆菌属
肠球菌属	消化链球菌属	二氧化碳噬纤维菌属	拟杆菌家族
	消化球菌属		戴阿利斯特杆菌属
革兰阴性球菌			产丝菌属
奈瑟球菌属	韦荣球菌属	螺旋体	
革兰阳性杆菌			密螺旋体属
乳杆菌属	放线菌属	真菌	
	真杆菌属	假丝酵母菌属	
	丙酸杆菌属	病毒	
革兰阴性杆菌		EB病毒	
肠杆菌属	卟啉单胞菌属		

二、继发性根管感染的微生态

继发性根管感染的微生态与原发性根管感染的微生态不同。初次根管感染是多种微生物混合感染,厌氧菌是优势菌,而继发性根管感染的微生物组成则种类减少,且以兼性厌氧的革兰阳性细菌占优势地位,主要为肠球菌属。

兼性厌氧的肠球菌常从根管内检出,有时存在于原发性根管感染,但多数是难治性病例治疗过程中或是再治疗病例中检出。目前,该类细菌最常见的为粪肠球菌,在许多病例中为唯一的检出细菌。其他的肠内细菌包括肠杆菌属、不动菌属、变形杆菌属、克雷伯菌属及假单胞菌等。目前尚不清楚这类细菌是最初就存在并在治疗过程中成为优势菌群,抑或是由于暂封不良或无菌手术的失败从而进入根管内。饥饿状态下的生存能力可能是治疗后根管内微生物种类的选择因素。在根充后慢性根尖周炎的牙齿中,培养阳性的微生物中粪肠球菌占优势地位。

对根管样本进行PCR为基础的16S rDNA序列分析的研究表明,继发性根管感染内的微生态较早期发现的更为多变,但粪肠球菌仍为频繁检出的细菌。粪肠球菌在再治疗病例中的检出率为22%(采用PCR和分子序列技术)。根充牙有无根尖周病损对粪肠球菌检出率无影响。总体来说,其检出率在再治疗病例中高于原发性感染中,是后者的3倍。其与根管治疗时的持续感染有关。相较有症状的病例,粪肠球菌更多是从无症状的病例的样本中培养出。

在根充后再感染的病例中频繁被检出的微生物类型还包括丙酸杆菌属、放线菌属、真菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

属、链球菌属等。新近研究发现河流漫游球菌可在根管再治疗病例中检出(17%)。

近来研究表明某些未培养出的细菌也是根管微生物的一个重要组成部分。有学者对治疗后存在于根管内的细菌采用16S RNA基因克隆编码分析,结果表明治疗后样本中有42%的种类是未获培养的细菌。在某些病例中,甚至占据主导位置。这些研究表明这些尚未特征化的细菌也可能参与持续性根管感染。

继发性感染根管的微生物种类见表11-5。

表11-5　继发性感染根管的微生物种类

兼性厌氧菌	厌氧菌	兼性厌氧菌	厌氧菌
革兰阳性球菌		革兰阴性杆菌	
肠球菌属	微单胞菌属	埃希菌属	卟啉单胞菌属
链球菌属	消化链球菌属	假单胞菌属	普雷沃菌属
葡萄球菌属		变形杆菌属	梭杆菌属
革兰阴性球菌		克留菌属	拟杆菌家族
	韦荣球菌属	肠杆菌属	沃廉菌属
革兰阳性杆菌			小杆菌属
乳杆菌属	放线菌属		坦纳菌属
芽胞杆菌属	丙酸杆菌属	真菌	
	真杆菌属	假丝酵母菌属	
	假分枝杆菌(*Pseudoramibacter*)		

三、根尖外感染的微生态

在大多数情况下,根尖周炎的炎症病损能够阻挡微生物到达根尖周组织。在某些特定情况下,微生物能够克服这些防御屏障并导致根尖外感染。最常见的根尖外感染是急性根尖脓肿,其特点是根尖周组织对根管内来源的大量有毒细菌的入侵的抵抗而形成化脓性炎症。另一种根尖外感染类型则不像急性脓肿,它不产生明显症状。这种情况主要是根尖周组织内微生物群体的建立,后者是通过以形成生物膜的形式黏附于牙根根尖外表面或在炎症体部内形成黏着的放射菌病性菌落而实现。这些根尖外的微生物被认为是即使完善根管治疗后根尖周炎仍持续的病因之一。

根尖外感染可依赖或独立于根尖内感染。急性根尖脓肿明显与根尖内感染有关,一旦根尖内感染通过根管治疗或牙齿拔除等方式而控制,脓液被引流,根尖外感染则通过宿主防御被抑制并减弱和消退。在某些特殊情况下,急性根尖脓肿内的细菌可能在根尖周组织中持续存在并建立与慢性根尖周炎有关的持续性根尖外感染。

大多数口腔微生物为机会致病菌,且仅有少数种属能够克服宿主防御机制并获得营养而在炎性根尖周组织中生长繁殖并导致根尖外感染。在难治性根尖周炎中检出的推定为口腔病原菌的种属中,有些可能具有毒力装置,理论上能够使它们侵入并在炎性根尖周组织中生存。

一些放线菌属和丙酸杆菌能够参与根尖外感染并导致病理实体,称为根尖放线菌病,只能通过根尖手术才能成功治疗。通过培养法、分子生物学技术等还可从持续性根尖周炎病损中检出密螺旋体、牙髓卟啉单胞菌、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、普雷沃菌、具核梭杆

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

菌等可疑致病菌。这些细菌均有一系列毒力因子，使得其可以避免或克服根尖周组织的宿主防御。

在早期研究中，认为在慢性根尖周病损是无微生物存在的。1939 年，Fish 发现微生物局限于感染区域。感染区域是最内部的组织，如脓肿中央，坏死并含有细菌。污染区为具有渗出性的脓肿壁，有细胞破坏迹象。激惹区主要指肉芽肿区，包含破骨细胞和组织细胞，刺激区则有成囊现象。1987 年，Tronstad 等证实厌氧菌能够在根尖周组织中存活并维持感染性的疾病过程。2006 年，Ricucci 等研究表明，细菌可以从脓肿和囊肿中检出，但并不能从肉芽肿检出。

根尖周样本检出的微生态特点为多菌种，厌氧菌为优势菌；兼性厌氧生物检出率为 73%，包括链球菌属、肠球菌属、肠杆菌属、假单胞菌属、寡养单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、芽胞杆菌属、假丝酵母菌属等。革兰阳性丝状杆菌包括衣氏放线菌、黏性放线菌、内氏放线菌、麦氏放线菌、丙酸蛛网菌，福赛斯拟杆菌和伴放线菌聚集杆菌的检出率超过 60%。产黑色素的厌氧杆菌则较少检出，还有病例报道根尖周病损内观察到放线菌病的聚集物(actinomycotic aggregates)。

扫描电镜证实根尖外表面存在生物膜，生物膜在原发性根尖周炎及再治疗病例的根尖表面均存在。除了细菌，还可以检出其他类型的微生物，包括病毒，如 HIV 阳性患者的根尖周病损可检出 HIV DNA，根尖病损检出巨细胞病毒和 EB 病毒；根尖病损处的单核/巨噬细胞和 T 淋巴细胞可发现巨细胞病毒，而 B 淋巴细胞内则无；EB 病毒的 DNA 和 EB 病毒核抗原 2(EBNA-2)的 mRNA 可从根尖周炎病损检出，且检出率明显高于正常组织。疱疹病毒未能从根尖周样本中检出。

根尖外感染的微生物种类见表 11-6。

表 11-6　根尖外感染的微生物种类

兼性厌氧菌	厌氧菌	兼性厌氧菌	厌氧菌
革兰阳性球菌		假单胞菌属	卟啉单胞菌属
肠球菌属	微单胞菌属	弧菌属	普雷沃菌属
链球菌属	消化链球菌属	肠杆菌属	梭杆菌属
葡萄球菌属		二氧化碳噬纤维菌属	拟杆菌家族
兼性双球菌属		真菌	
革兰阴性球菌		假丝酵母菌属	
	韦荣球菌属	曲霉属真菌	
革兰阳性杆菌		病毒	
乳杆菌属	放线菌属	HIV	
芽胞杆菌属	丙酸杆菌属	巨细胞病毒	
	真杆菌属	EB 病毒	
革兰阴性杆菌			

第五节　临床治疗对生物膜微生态系的作用

生物膜结构的性质以及组成微生物的生理特点，为生物膜提供了对抗生素、消毒剂以及杀菌剂等抗菌药物的内源性耐药能力。生物膜内的细菌在严苛环境下的生存能力明显强于

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

浮游细菌,这源于生物膜结构的特殊性。生物膜内部存在区域划分,保证有不同生长需要的细菌在其各自的生长区域内,且能够使细菌细胞之间交换遗传物质获得新的性状。

生物膜能够保护内部细菌不受外界环境的侵害,形成生物膜的菌株,细菌密度较高,细菌间空隙狭小并且含有大量的不溶水性蛋白多糖,使抗生素的渗入变得异常困难。生物膜还可以允许相同菌种和不同菌种之间营养的俘获和代谢的协同效应,提高局部营养物质浓度,使得细菌在苛刻的环境和营养缺乏的条件下也能生存。

一、牙菌斑生物膜对治疗药物的抵抗作用

相较于浮游细菌,牙菌斑生物膜内的微生物对药物的抵抗能力增强了上千倍。牙菌斑生物膜耐药的机制与细胞外多聚物基质(extracellular polymeric matrix,EPS)有关的抵抗力、与生长速率和营养可利用性相关的抵抗力、与抗性表性的采用有关的抵抗力有密切的关系。单个机制并不能实现生物膜对抗菌药物的整体抵抗力,需要这些机制在生物膜内共同作用。

二、药物对细菌生态的作用

(一) 次氯酸钠

次氯酸钠是应用最广泛的冲洗液。在 pH 4 ~7 之间,氯元素主要以次氯酸的形式存在;在 pH 大于 9 时,主要为次氯酸根。次氯酸钠中起杀菌作用的主要是次氯酸,后者能够干扰氧化磷酸化及 DNA 合成。

次氯酸钠在较低浓度即可以快速杀灭细菌,体外实验表明根管感染常见的革兰阴性厌氧杆菌如牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、中间普雷沃菌、对次氯酸钠的敏感性都较高。高浓度次氯酸钠(5.25%)30 秒即可杀灭肠球菌,低浓度的次氯酸钠杀灭肠球菌所需时间更长。

对于原发性根管感染的病例,单独使用 0.5% 的次氯酸钠(配合或不配合使用 EDTA 均可)即可提高根管预备的抗菌作用,但在数次封药复诊后根管内的细菌仍不能达到完全清除。高浓度次氯酸钠效果近似。体外研究和体内研究的区别包括杀菌药物的实际量、与微生物的接触程度。在体内实验中对细菌有潜在保护作用的物质在体外实验中则不存在。许多体内实验并不能证实高浓度次氯酸钠比低浓度时有更好的抗菌作用。对于多菌种生物膜,6% 次氯酸钠能够抑制细菌生长,且完全移除生物膜。微小消化链球菌和具核梭杆菌的混合生物膜对次氯酸钠显示出生长和抵抗的时间依赖性的协同作用。

根管治疗失败病例,次氯酸钠冲洗对于去除革兰阴性肠杆菌和白假丝酵母菌的效果优于粪肠球菌。特别是粪肠球菌形成生物膜时对次氯酸钠存在一定抵抗力。这种差异性体现了微生物对机械化学预备的敏感性的不同,这也可能是由于这些微生物具有不同的生物膜特点和牙本质穿透能力。

(二) EDTA

EDTA 的抗菌作用较弱。若直接暴露于 EDTA 较长的时间,EDTA 可以通过与细胞膜上的金属离子结合从而释放一些细菌的表面蛋白。这甚至可以导致细菌的死亡。但 EDTA 更重要的作用是,它是根管里面一个有效的螯合剂。与次氯酸钠联合使用时,通过作用于牙本质的无机物起到去除玷污层的作用。因此,EDTA 通过清洁和移除感染组织,来达到消除根管内细菌的作用。玷污层的去除还可能提高其他局部应用的抗感染药物的抗菌作用。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（三）过氧化氢

过氧化氢是广泛用于消毒灭菌的灭菌剂，在牙髓治疗中过氧化氢的使用逐渐减少。过氧化氢产生羟基自由基，可攻击微生物的组分如蛋白质和DNA。其对许多微生物（如病毒、细菌、真菌甚至细菌孢子）均有抗菌作用。对革兰阳性细菌的作用强于革兰阴性细菌。一些细菌产生的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶能够为它们提供部分保护来对抗过氧化氢。在对感染牙本质的消毒作用上，过氧化氢和氯己定体现出强的协同作用，两种药物的联合相较于各自单独使用可在低浓度时即可对牙本质产生更有效的消毒效果。过氧化氢与氯己定的协同作用在深部牙本质消毒作用的潜在应用具有一定的临床价值。

（四）碘合碘化钾

碘化合物是最古老的且目前仍被广泛使用的消毒药物之一。碘的活性弱于次氯酸钠里的氯，但其能够迅速杀灭细菌、真菌、结核分枝杆菌、病毒甚至芽胞。碘在水溶液中的不稳定促使了碘伏的产生。碘伏是碘和水溶剂的复合物，后者可以缓慢地释放碘。碘伏对某些真菌和细菌芽胞的杀菌作用弱于碘酊（酒精碘溶液）。碘可以快速的穿透进入微生物并通过攻击蛋白质、核苷酸和其他细胞的关键分子从而导致细胞的死亡。碘合碘化钾（IPI）中碘化钾被用于将碘溶于水中，其抗菌活性则由碘携带，碘化钾没有抗菌作用。

碘合碘化钾用于再治疗过程，为了清除肠球菌和真菌。研究表明体外2% IKI可有效杀灭白假丝酵母菌；在15分钟内清除感染牙本质小管内的粪肠球菌。在氢氧化钙封药前使用5% IPI冲洗可降低粪肠球菌顽固菌株出现的频率。在根管内，碘复合物与多种物质如牙本质和各种蛋白质接触。IPI与坏死感染的根管的化学环境相互作用的研究显示牙本质能够降低甚至消除0.2%或0.4% IPI对粪肠球菌的作用。牙本质基质（主要为牙本质胶原）和热灭活的粪肠球菌和白假丝酵母菌的细胞能够抑制IPI的抗菌活性。碘成分的失活可能是其难于获得良好杀菌效果的原因之一。

（五）氯己定

氯己定作为冲洗液和根管封药在根管治疗中得到越来越多的应用。氯己定可渗透进入细胞壁或外膜（革兰阴性细胞）并且攻击细菌细胞质或真菌质膜的内膜。高浓度时氯己定可以引起细胞内组分的凝结。

氯己定对革兰阳性细菌、革兰阴性细菌和真菌均有效，对革兰阳性细菌的作用优于革兰阴性细菌。分枝杆菌和细菌芽胞对氯己定耐药。研究表明氯己定对多种口腔微生物具有杀灭作用。氯己定对浮游状态的衣氏放线菌杀灭作用强于氢氧化钙和碘合碘化钾（IKI）。氯己定对病毒的杀灭效果不佳，其活性被病毒的脂质包膜所限制。

Gome等通过比较2%的氯己定凝胶和氢氧化钙抑制粪肠球菌生长的体外实验，使用氯己定凝胶1、2、7和15天可以完全抑制粪肠球菌生长，而氢氧化钙没有明显的抑制作用。氯己定作为根管封药应用时，2%氯己定凝胶对根管内白假丝酵母菌和粪肠球菌的杀灭效果优于纯氢氧化钙或氢氧化钙与氯己定的混合物。

（六）氢氧化钙

氢氧化钙主要用于根管封药，其对变异链球菌、牙龈卟啉单胞菌和脆弱拟杆菌的抗菌效能显著优于传统的酚类试剂。氢氧化钙封药后无菌根管检出率达到97%，对某些能引起严重临床症状的细菌（如产黑色素类杆菌和牙龈卟啉单胞菌）有高效快速的抗菌效果。氢氧化钙对奈氏放线菌和依氏放线菌也有较强杀菌作用。封药1周或者更长时间为氢氧化钙杀灭

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

细菌的理想封药时间。

目前几乎所有的研究都认为氢氧化钙作为抗菌剂的作用原理与其 pH 值有直接关系。氢氧化钙的 pH 高达 12.5，将其置于根管内，可升高局部 pH 值，而绝大多数根管内的细菌都无法在碱性环境下生存，感染根管内常见的几种细菌在直接接触氢氧化钙后很短时间内便可被消除。

氢氧化钙的抗菌活性与其能在水性环境中释放羟基离子有关。羟基离子是一种强氧自由基，可与多种生物大分子发生反应，通过导致细菌的细胞膜损伤、蛋白质变性以及 DNA 损伤等三种途径破坏细菌细胞，达到抗菌杀菌的目的。氢氧化钙并非为全能的根管消毒药物，其对某些与根管治疗失败相关的微生物，如粪肠球菌、真菌等，其抗菌效果并不理想。

（七）其他药物和杀菌手段

臭氧是众所周知的对细菌、真菌和病毒均十分有效的抗菌成分。臭氧水与 2.5% 次氯酸钠的抗菌作用几乎相当，细胞毒性更小；臭氧对浮游和悬浮在液体中的粪肠球菌细胞有抗菌作用，但对生物膜内的粪肠球菌则几乎无作用。

0.2% 溴棕三甲胺对粪肠球菌生物膜有杀菌作用。甘草萃取液对粪肠球菌有杀菌作用。体外实验表明生物玻璃（BAG）可以清除牛牙本质块的粪肠球菌感染。

紫外线能够提高次氯酸钠冲洗液的杀菌效果；可清除培养基上的根管感染多细菌层。

三、抗药细菌的产生

生物膜是根管内细菌抗药能力的主要来源。生物膜内的细菌较浮游细菌抗药能力明显增强，与以下机制有关：

（一）与细胞外多聚物基质有关的抗药能力

生物膜内细菌具有抗菌能力一个重要的原因是胞外聚合物（extracellular polymeric substances，EPS）对抗菌药物的失活。EPS 形成生物膜的基质，其作为药物弥散的屏障和反应槽（中和剂），改变生物膜内细菌对抗菌药物治疗的抵抗能力。这一功能可通过细胞外产物和酶的滞留而增强。EPS 具有高电荷以及波浪状的结构，阻碍了抗菌药物通过离子通道或静电作用进入生物膜。这是因为抗菌药物多带有阳性电荷，EPS 含有负的或中性的多糖。

生物膜基质聚合物的主要成分可与抗菌药物（如碘、氯、过氧化氢等）发生化学反应或直接中和。生物膜状态的细菌还可产生改性的酶，使抗生素失活。细菌释放的高浓度的酶（如 β 内酰胺酶）可以失活内酰胺抗生素。

生物膜还可将药物失活酶保留在细胞外多糖中，增强生物膜的屏障功能。不同种细菌之间的协同作用也可能阻碍抗生素的作用。如粪肠球菌能够使甲硝唑失活，保护多菌种生物膜内的脆弱拟杆菌。产气克雷伯菌仅能产生有限的 EPS 基质，通过多菌种生物膜中其他能够产生较多 EPS 的细菌得以抵抗抗菌药物。

（二）与生长速率和营养可利用性相关的抗药能力

成熟的生物膜是由多层包埋入 EPS 基质的细菌组成。生物膜内局部的高细胞密度使得深层的细胞暴露于营养缺乏和低氧化还原电位的环境中，与浮游细胞或表面细胞的生存条件有大幅的改变。

生物膜中的细菌呈现一种生长缓慢的状态，称为饥饿状态。大多数抗生素对生长活跃的细菌有很强的杀灭作用，处于静止状态的细菌对其具有较强耐药力。由于厚的生物膜氧

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

气的缺乏,使得其对抗菌药物的抵抗能力更强。成熟生物膜内,生长速率效应对抗菌药物的抵抗作用更加明显。

(三) 与耐药表型的选择有关的抗药能力

生物膜的长期存在导致更耐药的表型的被选择。细菌可以感知一个表面的邻近,上调EPS,并且在结合后快速改变它们对抗生素和杀菌剂的敏感性(连接-特异耐药表型)。营养限制导致细菌生长速率降低、应力应答基因、休克蛋白的增加以及多重药物外排泵的激活。以上因素共同提高了生物膜内细菌的耐药能力。

亚致死浓度抗生素和杀菌剂可作为诱导剂转录激活那些更耐药的表型,如能表达多重耐药操纵子和外排泵的表型。生活于生物膜内的某一细菌细胞暴露于不良压力或者低浓度的抗菌药物时,能够形成特化的存活细胞,称为顽固细胞。这些顽固细胞属于一种表型变异,在去除不良压力后,当其他溶解的细胞释放出营养时,这些顽固细胞则会快速地生长。生物膜内富于顽固细胞,这些细胞能在治疗时存活并在治疗后再次增殖。

粪肠球菌作为再治疗根管中最常检出的细菌,与根管治疗时的持续感染有关。粪肠球菌能够在氢氧化钙等药物形成的高 pH(pH>11.5)环境下生存。粪肠球菌的抗药机制除了能够形成生物膜外,还能够侵入牙本质小管内,躲避机械化学预备和根管消毒药物。更重要的是,粪肠球菌的质子泵能够通过控制质子在细胞膜的"进出"维持 pH 的动态平衡,使细胞质 pH 只在一定的小范围内波动,保证细菌细胞质内蛋白质和酶的正常生理功能。在高碱性的环境中,粪肠球菌的质子泵使质子进入细胞内,酸化细胞质,降低 pH 值,保持细胞质理想 pH 值状态,只有在超出质子泵的调节范围后,菌细胞内 pH 升高,细菌死亡。

(黄定明　侯本祥　朱眪　张岚　郑庆华)

参 考 文 献

1. Appdbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. Oral Microbiol Immunol, 2007, 22: 169-171
2. Barbin LE, Saquy PC, Guedes DF, et al. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. J Endod, 2008, 34: 1508-1514
3. Chen V, Chen Y, Li H, et al. Herpesviruses in abscesses and cellulitis of enodontic origin. J Endod, 2009, 35: 182-188
4. Ferreira DC, Paiva SS, Carmo FL, et al. Identification of herpesviruses types 1 to 8 and human papillomavirus in acute apical abscesses. J Endod, 2011, 37: 10-16
5. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, et al. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20: 289-295
6. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, et al. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. J Endod, 2007, 33: 1049-1052
7. Itoh T, Nakamura H, Kishi J, et al. The activation of matrix metalloproteinases by a whole-cell extract from *Prevotella nigrescens*. J Endod, 2009, 35: 55-59
8. Kakoli P, Nandakumar R, Romberg E, et al. The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. J Endod, 2009, 35: 78-81
9. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. Biochemistry (Mosc), 2005, 70: 267-274
10. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, et al. Treponema species detected in infected root canals and acute api-

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

cal abscess exudates. J Endod,2010,36:1796-1799

11. Ozok AR,Wu MK,Luppens SBI,et al. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus* (micromonas) micros. J Endod, 2007,33:819-822
12. Rôças IN,Siqueira JF Jr. Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated Bacteroidetes clone X083 in primary endodontic infections. J Endod,2009,35: 1359-1362
13. Rôças IN,Siqueira JF Jr. Occurrence of two newly named oral treponemes-*Treponema parvum* and *Treponema putidum*-in primary endodontic infections. Oral Microbiol Immunol,2005,20:372-375
14. Shuping GB,Orstavik D,Sigurdsson A,et al. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. J Endod,2000,26:751-755
15. Wang Q,Zhou XD,Zheng QH,et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in chronic apical periodontitis associated with symptoms. J Endod,2010,36:1790-1795
16. Williams JM,Trope M,Caplan DJ,et al. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR),and cultivation during endodontic treatment. J Endod,2006,32:715-721
17. Yildirim S,Yapar M,Kubar A,et al. Human cytomegalovirus,Epstein-Barr virus and bone resorption-inducing cytokines in periapical lesions of deciduous teeth. Oral Microbiol Immunol,2006,21:107-111

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第十二章

牙周病微生态

近年来，随着微生物鉴定的分子生物学技术的发展，已经明确口腔微生物群落形成微生物复合体，又称为生物膜，其中包含超过700种的菌种。以上微生物复合体形成“微生态系”，其中，微生物之间相互竞争和协作，微生物细胞与宿主细胞之间相互作用。

牙周微生态学研究牙周微生物复合体以及与之相关的周围环境（宿主）之间的关系。牙周微生态系包括牙周微生物集合（生物膜）、与之相关的牙周特定部位的有机和无机组分。我们过去对牙周微生态的研究主要回答的问题是“它们是什么？”，即牙周部位微生物的特定组成；近来我们逐渐回答的是“它们在其中做什么？”。

口腔菌群生存的代谢活性决定了它们从生存到致病等生理特点。了解牙周微生态系中的微生物从单个细胞到群落、微生态系的演替过程，以及微生物的代谢特点、微生物之间以及微生物与宿主之间的相互作用，不仅回答了“它们在做什么”这个问题，而且，可能为我们通过调控牙周微生态系，从而控制牙周病的发生、发展提供思路。

第一节　牙周微生态系的构成

一、牙周组织

（一）牙龈上皮屏障

牙周上皮是一种口腔表面，覆盖牙周附着，保护下面的组织，最重要的功能是封闭牙齿周围。上皮的隔离作用在宿主免疫中起积极作用。过去的牙周病学中认为上皮只是被动的覆盖，当牙周炎进展时，上皮失去屏障功能并被破坏。目前认为，上皮的阻隔对感染不仅起到物理屏障作用，而且还在宿主防御中扮演积极的角色。

上皮细胞是与牙周和口腔黏膜健康相关的主要细胞，常常与细菌产物接触。牙齿表面和附着在黏膜表面的龈上和龈下菌斑生物膜释放出细菌抗原，上皮细胞对细菌作出积极应对，它们分泌白细胞介素-8、其他趋化因子和细胞因子，以警告所有类型的细胞、吸引中性粒细胞、产生天然抗菌肽以应对菌斑生物膜。这些抗菌肽是天然免疫系统的组成部分，该系统使微生物入侵得到控制，并维持牙周袋内微生物的生态。所以，上皮通过信号调节宿主反应以及整合天然和获得性免疫，积极参与了对感染的反应。上皮对细菌的另一反应是通过增殖、改变细胞信号调节以及改变细胞分化和细胞死亡从而改变组织的稳定性。

对于上皮天然防御反应的新认识、上皮与免疫系统的相互作用以及上皮细胞和细菌之

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

间的相互作用的积极意义等促使我们对上皮组织的完整功能以及组织对感染的反应等有了新的认识。

1. 上皮结构和功能 每种上皮组织都有3个基本特性:第一,上皮细胞通过特殊的细胞-细胞连接相互紧密结合在一起;第二,上皮细胞分泌基底板(basal lamina),使上皮细胞有序地组成组织,并与相邻的结缔组织分开;第三,上皮细胞中具有由角蛋白中间纤维(keratin intermediate filament)和肌动蛋白微丝(actin filament)和微管(microtubule)组成的细胞骨架(cytoskeleton)。以上使组织的结构完整、具有屏障功能。近年对以上结构蛋白的研究显示,上皮细胞结构是靠复杂的角蛋白丝使相邻细胞紧密连接在一起,这不同于结缔组织中的细胞间结构胶原是在细胞外。

上皮细胞完整性受各种致病微生物的威胁,它们一方面通过攻击细胞间连接,使上皮细胞分开。伴放线菌聚集杆菌感染人牙龈上皮细胞,牙龈上皮细胞黏着连接蛋白E-钙黏素水平降低。Edith等研究表明,牙龈卟啉单胞菌ATCC33277可降解人口腔角化细胞HOK-16细胞的β-连环蛋白、γ-连环蛋白和p120-连环蛋白。另一较普遍的机制是细菌通过信号调节肌动蛋白细胞骨架(actin cytoskeleton),造成细菌侵入上皮细胞内。牙龈卟啉单胞菌也通过该机制内化入牙龈上皮细胞中。

2. 抗菌肽和蛋白及其在微生态中的作用 牙龈上皮表达天然抗菌肽或蛋白是非特异性天然免疫系统中的一种生化屏障。抗菌肽分子是一类分子量在3500~6500Da,含有小于100个氨基酸的蛋白,包括α-防御素、β-防御素和cathelicidin(LL-37的前体)等。这些阳离子多肽通过聚集在微生物阴离子表面,在其上形成空隙或破坏微生物膜,从而直接杀灭微生物;对于革兰阳性和阴性菌都有较宽的抗菌活性,也能抵抗真菌和一些病毒,阻止病原菌入侵,在抗感染的天然免疫中发挥常规保护作用。一些抗菌肽还对单核细胞、T细胞等具有选择性趋化作用,从而加速免疫和伤口愈合过程,对炎症起调节作用。个体表达差异可能是疾病易感性的原因之一。

α-防御素、β-防御素和LL-37等分布在牙龈的不同部位,提示它们在牙周微生态中可能具有不同的作用。迄今发现β-defensins(hBDs)hBD-1、hBD-2和hBD-3在牙龈上皮细胞中都有表达;在牙龈上皮中检测到LL-37mRNA的表达,但很难检测到LL-37肽分子的存在;α-防御素和LL-37均大量存在于从结合上皮移行至龈沟中的中性粒细胞中。因此,结合上皮主要受中性粒细胞分泌的α-防御素和LL-37的保护,而牙龈上皮受β-防御素的保护。口腔上皮的胞质中还表达抗菌蛋白钙网蛋白(calprotectin)由分子量为10 000~14 000Da的两个亚单位组成,该蛋白能抑制牙龈卟啉单胞菌等细菌结合和感染口腔上皮。

3. 上皮在天然和获得性免疫中的作用 上皮细胞还通过改变细胞信号对细菌作出反应。朗格汉斯细胞作为抗原呈递细胞是联系上皮和获得性免疫的桥梁。朗格汉斯细胞表面受体是细胞间和信号转导通路的关键,其中,Toll样受体是介导细胞对细菌反应的关键受体。此外,上皮分泌的抗菌肽也具有信号调节的作用。hBD-2通过CC趋化因子受体6(CC chemokine receptor 6,CCR6)刺激树突状细胞(dendritic cell),上调IL-8;LL-37趋化中性粒细胞,并刺激伤口愈合的蛋白多糖的表达。在上皮细胞对细菌刺激作出反应的过程中,树突状细胞、T细胞、巨噬细胞受到刺激,将上皮细胞天然免疫和抗原识别的获得性免疫联系在一起(图12-1)。

牙龈上皮通过有效的物理和生化屏障、在环境刺激下表达趋化因子和细胞因子等方式,

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

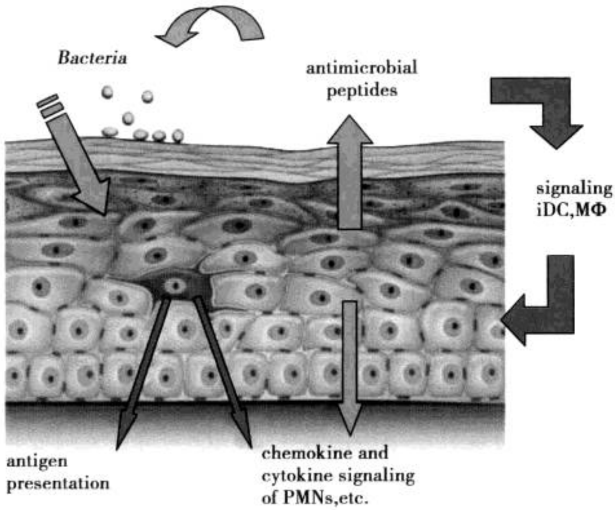


图 12-1 上皮屏障

注:上皮屏障在细菌攻击下,向所有细胞发出信号,角化细胞和朗格汉斯细胞(紫色)表达趋化因子(如 IL-8)和细胞因子和黏附分子(如细胞间黏附分子-1);朗格汉斯细胞还从组织中移出,参与抗原呈递,引发获得性免疫反应;上皮分泌的抗菌肽水平上调;以上反应都直接作用于入侵的细菌,并对未成熟的树突状细胞和巨噬细胞起信号调节作用,上调上皮对细菌的反应。图片来自:Beverly A Dale. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. Periodontology 2000, 2002, 30:70-78. P75, Fig 3

在维持牙周健康中起着积极作用。在健康状态下,上皮的这种屏障和天然防御功能是十分有效的。当这个第一道防线被破坏,获得性免疫将成为后备的防线。

(二) 沟内上皮和结合上皮

沟内上皮为龈沟的衬里上皮,从结合上皮的冠方延伸到游离龈的顶部,为薄的非角化复层鳞状上皮,有上皮钉突,缺乏颗粒层和角化层。沟内上皮具有半透膜的作用,细菌产物可通过沟内上皮进入牙龈;牙龈结缔组织的组织液和防御细胞也可通过沟内上皮进入龈沟中。

结合上皮(junctional epithelium, JE)是牙周组织的另一道天然屏障。结合上皮由非角化复层上皮构成,无角化层、无上皮钉突。JE 的内侧基板通过大量半桥粒紧密附着在牙体硬组织表面,JE 的基底细胞却被外侧基板与结缔组织分开,使 JE 与其下的结缔组织之间的结合较口腔牙龈上皮疏松。结合上皮细胞具有与巨噬细胞和中性粒细胞一样的内化功能,在抵御细菌入侵时有保护作用。其次,结合上皮快速更新、不断向沟内蜕落以及龈沟液的冲刷能有效抑制细菌对上皮的定植。而且,外侧基板和内侧基板可防止细菌深入上皮组织内,但是允许白细胞及其分泌的抗菌剂和抗体进入龈沟中。结合上皮细胞还通过表达趋化因子(IL-8 和补体 C5a),有利于中性粒细胞至炎症部位的浸润;结合上皮表达细胞间黏附因子-1(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)等帮助中性粒细胞从血管中穿过。中性粒细胞分泌 α-防御素、LL-37 等抗菌肽至结合上皮和沟内上皮,也起到抵抗细菌入侵的作用。中性粒细

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

胞还表达钙网蛋白，防止牙龈卟啉单胞菌对结合上皮的结合和入侵。

（三）龈沟和龈沟液

游离龈与牙面之间的间隙称为龈沟。龈沟是牙周生态系中重要的生态区，也是正常口腔微生物最大的滞留区和保护区。龈沟液来自牙龈结缔组织，通过结合上皮间隙，进入龈沟中。结合上皮（junctional epithelium，JE）的细胞间隙的体积占结合上皮体积的18%，这个空间足以使大分子和细胞通过。因此，细菌及其毒性产物以及其他抗原可以通过结合上皮进入牙龈组织。这样持续的较小的入侵导致结合上皮固有层处于轻度炎症状态。为此，中性粒细胞由于细菌产物的存在而通过结合上皮被冲入到龈沟液中。从这条途径，每15分钟有25 000个中性粒细胞进入口腔。除此之外，在龈沟液中还存在脱落的上皮细胞。

健康状态下，龈沟液既不完全像血清，也不是炎性渗出液。它们比在血清中有稍高浓度的无机离子和较多的碳水化合物。血清中的免疫球蛋白、IgG、IgM和IgA也存在于GCF中，它们可能参与调控细菌进入上皮组织。抗体有一功能就是启动补体级联反应，从而产生各种酶，破坏细菌的细胞壁；这些酶同时也能损伤宿主细胞，这也是结合上皮下固有层处于炎症状态的另一个原因。龈沟液中发现各种酶，包括来自细胞崩解的酸性磷酸酶、葡萄糖醛酸酶、溶菌酶、透明质酸酶和胶原酶等，它们是入侵的细菌和防御的中性粒细胞发生抗争的证据。

龈沟液对维持口腔正常菌群以及防止外来细菌的定植具有重要作用，同时，龈沟液也为微生物的生长提供了蛋白质、脱落上皮等营养来源。

（四）牙周袋

结合上皮由于炎症刺激向根方增殖，大量中性粒细胞浸润，使上皮细胞间连接更加疏松；当浸润的白细胞体积超过结合上皮体积的60%时，结合上皮的连接和附着受到影响，靠近冠方的结合上皮从牙面剥离，使龈沟底移向根方，形成牙周袋。

牙周袋内和龈沟的生态条件有很大差别。牙周袋为专性厌氧菌、革兰阴性菌等微生物菌群共同形成复合体提供了条件。许多致病微生物在来自环境的特定信号的调节下促进毒力因子的表达。具有意义的条件有：pH值、氧化还原电势、渗透压、温度、铁镁钙离子的浓度、氧分压、抗体滴度等。当氧的浓度升高时，伴放线菌聚集杆菌毒力因子白细胞毒素的释放将增加3倍。但是，铁离子的改变不影响伴放线菌聚集杆菌白细胞毒素的释放；铁离子的量决定了牙龈卟啉单胞菌膜蛋白的表达。牙周致病微生物毒力因子的表达对生态环境条件有强烈的依赖性，这部分解释了为什么在牙周感染中从细菌初期定植到发病经历了一个较长的过程。在细菌入侵时，牙周组织中的细胞通过不同的受体识别细菌和不同的抗原。在牙周袋上皮细胞膜上发现有较健康牙龈组织丰富的Toll样受体-2（Toll-like receptor-2，TLR-2），它能识别细菌的肽聚糖（peptidoglycans，PCN）、脂蛋白、脂磷壁酸（Lipoteichoic acids，LTAs）等；蛋白酶活化受体（protease activated receptors，PARs）主要在中性粒细胞、牙龈成纤维细胞和成骨细胞中表达，介导细胞对凝血酶、胰酶样丝氨酸蛋白酶等细胞外蛋白酶的细胞反应。在体外实验中，牙龈卟啉单胞菌的蛋白酶刺激口腔上皮细胞内的PARs，导致促炎细胞因子IL-6和IL-8的分泌。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、龈上菌斑和龈下菌斑生物膜

目前认为，龈上菌斑主要由革兰阳性细菌组成，包括血链球菌、变异链球菌、缓症链球菌、唾液链球菌和乳杆菌。龈下菌斑主要由革兰阴性厌氧菌组成，包括伴放线聚集杆菌、福赛斯坦纳菌、弯曲菌、二氧化碳噬纤维菌、齿蚀艾肯菌、具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌以及口腔螺旋体，例如齿垢密螺旋体。无论是牙面上还是在牙龈组织中局部都可积聚高浓度的细菌产物，包括脂肪酸的终产物、氨、过氧化氢、氧化剂、二氧化碳等，它们将影响微生物菌群内的细菌和宿主本身。

（一）龈上菌斑的形成

1. 几分钟至 2 小时内　牙面或口内其他表面选择性吸附糖蛋白成分，形成获得性膜。

2. 4 小时～1 天　早期定植菌在大约 4 小时后黏附在以上的获得性膜上，其中包括缓症链球菌、血链球菌、咽峡炎链球菌、口腔链球菌等链球菌；少量革兰阳性杆菌，例如内氏放线菌最初仅不断地、疏松地定植于获得性膜上，在 6 小时内数量基本保持不变；大多数最初定植于获得性膜上的细菌这时已经死亡。

变异链球菌等细菌初期黏附：变异链球菌、血链球菌和唾液链球菌合成细胞外多糖，特别是不溶解于水的 1,3-α-葡聚糖（*S. mutans*）使菌斑趋于稳定；链球菌和放线菌的相互凝集使菌斑进一步形成；来自唾液的新细菌占据菌斑表面，疏松定植的细菌又被唾液冲走。

3. 2～4 天　接着菌斑的堆积很快更加复杂。链球菌的比例减少；兼性或专性厌氧的放线菌占较大比例；革兰阴性菌中韦荣菌占主要地位；这时，在龈上菌斑中革兰阴性厌氧杆菌，如卟啉多胞菌、普雷沃菌或梭杆菌等数量非常微量。

4. 菌斑继续成熟至 1 周后，龈上菌斑中可检出螺旋体和可动杆菌。

Forsythl Institute 的一项研究比较 30 例牙周健康者、8 例牙周炎患者和 18 例无牙殆受试者初期龈上生物膜形成过程中早期微生物变化。首先在基线从每颗牙（或义齿）近中面取龈上菌斑，采用 DNA-DNA 探针检测 41 种细菌。然后清洁牙齿或义齿后 7 天停止口腔卫生措施。随机选择象限，从 7 颗牙上取龈上菌斑，观察清洁后 0 小时（基线）、2 小时、4 小时、6 小时、1 天、2 天、4 天和 7 天每个时间点平均每个受试者每个取样位点各菌种的菌落数。结果显示，在健康、牙周炎、无牙殆者，刚清洁牙面后平均总 DNA 探针菌落数（10^5，±SEM）分别为 45±7、66±12 和 52±11。2 天时健康组（61±11）和牙周炎组（64±13）的总菌落计数均超过基线值，无牙殆患者菌落计数（57±18）在 4 天时超过基线值。大多数菌种在基线时的平均菌落数在牙周炎组最高，无牙殆最低。第二天时，链球菌、伴放线菌聚集杆菌、微小消化链球菌、齿蚀艾肯菌和小韦荣菌的菌落数均回到基线值（图 12-2）。其他菌种的菌落数在 4～7 天时回到基线值。链球菌在第 2～7 天之间呈一平台的趋势。牙周炎和健康者龈上菌斑的再定植模式几乎完全相同，都比无牙殆快。但是，7 天内每种再定植细菌的所占比率和达到的最高水平是不相同的。

（二）龈下菌斑

1. 龈下菌斑中牙周致病菌生存的策略　龈上菌斑刺激造成龈沟加深和牙龈水肿形成早期的一个龈下区域。接着该区域由于结合上皮的根向移位和结缔组织附着的进一步丧失

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

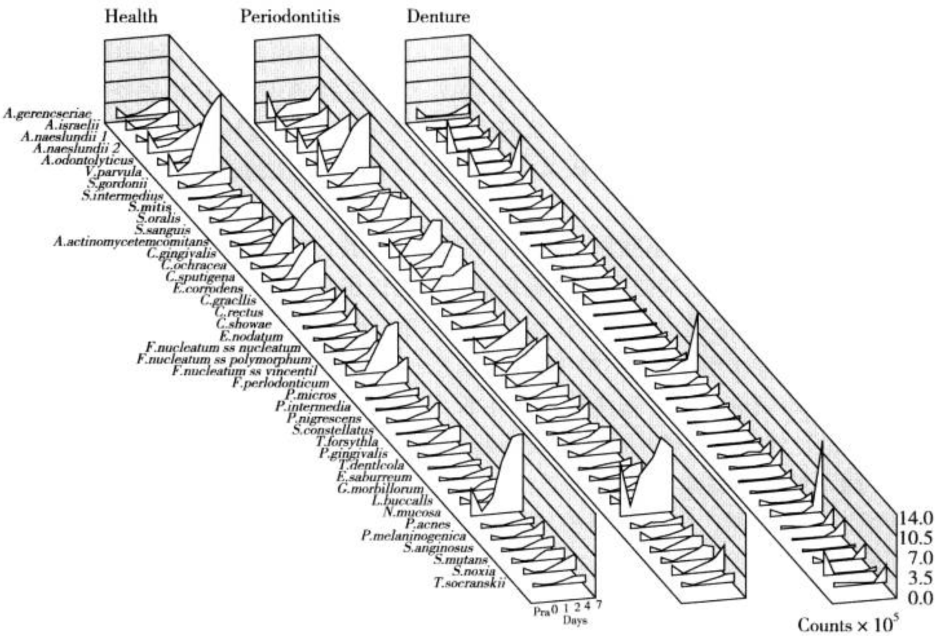


图 12-2　龈上菌斑中 41 种微生物的平均菌落计数（$\times 10^5$）

注：志愿者龈上洁治后 7 天内不采取任何口腔清洁措施，洁治前以及洁治后 1 天、2 天、4 天和 7 天取龈上菌斑。比较牙周健康组、慢性牙周炎组和无牙全口义齿组不同时间点每种细菌的平均菌落计数。图片来自：Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, 2005, 38: 135-187. P166, Fig. 25

而加深。龈下区域为许多细菌提供了较龈上有利的定植环境：免于唾液的冲刷作用和口腔清洁措施的清除；细菌可选择性定植（例如可动微生物，特别是螺旋体），而不是如龈上细菌沉积在菌斑表面；龈下区域因此提供了稳定的牙齿表面和不断脱落更新的不稳定的上皮表面。两个表面都受到富含氨基酸、肽和蛋白质等含氮化合物等营养成分的龈沟液的不断冲刷，其中包含有很多牙周致病菌必需的生长因子：例如提供能量所需氨基酸和脂肪酸；齿垢密螺旋体赖以生存的 α_2-球蛋白；普雷沃菌、卟啉单胞菌等产黑色素的革兰阴性厌氧菌需要的血红素（hemin）、铁离子和（或）维生素 K；脱落上皮也可提供营养。牙周深袋对专性厌氧菌提供生长的有利条件，包括低氧化还原电势（-80 ~ -100mV）和平均约 13mmHg 的较低的氧分压等。

随着龈沟加深，龈下环境变得更加稳定，形成中性的 pH 值和厌氧的环境。在这种条件下，龈下发现不解糖及厌氧和（或）水解蛋白的细菌，包括梭杆菌、真杆菌、弯曲菌、普雷沃菌和卟啉单胞菌等。

水解蛋白的细菌能通过胞膜上结合的和（或）细胞外分泌的蛋白酶，把含氮化合物降解成小的肽和氨基酸。例如，牙龈卟啉单胞菌具有牙龈素（gingipains），一种胰蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶，以及二肽基肽酶（dipeptidyl peptidases）；中间普雷沃菌具有几种蛋白酶可以降解清蛋白和免疫球蛋白。

不解糖的细菌在代谢上展现多种多样的途径。牙龈卟啉单胞菌和中间普雷沃菌都具有

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

一系列代谢酶，负责将天门冬氨酸转化成醋酸和琥珀酸（醋酸-琥珀酸途径）。而且，牙龈卟啉单胞菌还有代谢酶将谷氨酸转化成丙酸和丁酸（丙酸-丁酸途径）以及琥珀酰辅酶A结合酶（succinyl-CoA synthase）作为桥梁，连接醋酸-琥珀酸途径到丙酸-丁酸途径。梭杆菌则利用谷氨酸作为营养，产生醋酸和丁酸。优杆菌可将亮氨酸转化成异戊酸或异己酸。直肠弯曲菌像牙龈卟啉单胞菌和中间普雷沃菌一样，则将冬氨酸代谢成琥珀酸，但是需要甲酸作为还原剂。

牙龈卟啉单胞菌喜欢以小肽作为营养，特别是二肽类；而中间普雷沃菌和具核梭杆菌既能利用二肽类，也能利用氨基酸并偏好氨基酸。因为该菌自身能将蛋白质降解成肽，接着马上利用这些生成的肽，这提示了该菌在竞争利用肽的优势。但是，能水解蛋白的细菌也可提供肽和氨基酸给不能水解蛋白、不解糖的细菌，例如梭杆菌。同时，氨基酸的代谢终产物也是其他细菌的基本营养。口腔密螺旋体的生长严格依赖异丁酸。这些发现提示，在龈下微生态系中，无论是代谢竞争还是合作都较普遍。

（三）龈下牙周致病微生态的建立

细菌蛋白酶和代谢产物以及细菌的成分（如脂多糖）对宿主炎症和免疫反应有诱导作用。蛋白酶除了可直接降解宿主组织，还可通过降解宿主防御系统中的蛋白，例如补体、免疫球蛋白和凝血系统，从而间接干扰宿主防御系统。代谢终产物如短链的脂肪酸（丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸）、氨、硫化物（硫化氢和甲硫醇）损伤宿主细胞功能，从而干扰宿主防御系统。

龈下菌斑中的微生物的最适生长条件是中性的pH值和厌氧的环境。因此，牙龈卟啉单胞菌在龈上pH值偏酸的环境的检出率很低。相反，中间普雷沃菌和具核梭杆菌能在酸性和中性pH值环境生长，所以它们在龈上菌斑中较易被检出。而且，中间普雷沃菌和具核梭杆菌还能通过氨基酸代谢改变酸碱平衡，中和偏酸环境。中间普雷沃菌能利用葡萄糖和含氮化合物，并根据营养条件改变自己的代谢特点。当葡萄糖缺乏时，中间普雷沃菌将提高蛋白活性，形成具有细胞毒的代谢终产物。

这些发现都提示，在龈下致病微生物生态系的建立是有一定顺序的：首先，中间普雷沃菌和具核梭杆菌定植在牙龈浅袋中，这里的pH值是变化的，有时是呈酸性的。接着以上细菌促进中性pH值环境的建立。中间普雷沃菌和具核梭杆菌的定植诱导宿主防御系统，发生龈下区域的炎症反应，造成富含宿主蛋白的龈沟液的增加。因为龈沟液中富含各种宿主防御蛋白，龈沟液的增多一方面有利于防止细菌的攻击；同时，龈沟液也为牙周袋中水解蛋白、不解糖（asaccharolytic）的细菌提供底物。龈下细菌能降解宿主防御蛋白的活性以及直接破坏宿主牙周组织是龈下细菌能在龈下生存的主要代谢方面的适应方式。

Foraythl Institute研究人员比较了30例牙周健康者和8例牙周炎患者从基线到第7天龈下生物膜形成中微生物变化，结果，健康者和牙周炎患者平均总DNA探针菌落数（10^5，±SEM）在试验开始前分别为16±3和32±10；在刚清洁牙面后分别为5±1和4±1。第2天时，健康（22±6）和牙周炎组（56±31）的总菌落数超过基线值。牙周炎和健康者龈下菌斑的再定植模式存在巨大差别：在牙周炎患者中，大多数菌种菌落数快速增加，到第2天远高于基线值。包括内氏放线菌基因种2等放线菌和链球菌等17种细菌在第7天减少到基线水平。其他菌种的菌落数则保持不变或增加。一些菌种经过7天未达到基线水平，它们包括

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

纤细弯曲菌、缠结真杆菌、齿龈卟啉单胞菌和齿垢密螺旋体。对于健康者，大多数菌种菌落数缓慢增加，到第7天到达或超过基线水平。这些数据显示，在停止口腔卫生措施的情况下，牙周炎患者龈下菌斑再定植的动力学变化与牙周健康者明显不同。

（徐　屹）

第二节　牙周病的病因学说

一、特异菌斑学说及非特异菌斑学说

特异和非特异菌斑学说是1976年由美国密歇根大学的一位学者Loesche Wallter提出的。追溯牙周病微生物病因，牙周病病因经历了从特异菌斑学说到非特异菌斑学说，再回到特异菌斑学说的认识过程。非特异病因学说核心内容是指“任何大块的菌斑都可导致疾病的发生”，牙周病的发生是由于整个菌斑微生物群中的有毒产物造成的。当只有少量菌斑时，其有毒产物可以被宿主中和；大量菌斑产生大量毒物，超出了宿主的防御能力时，即造成疾病的发生。特异菌斑学说是指“只有某种菌斑是致病的，其致病力取决于其中的特异微生物”，菌斑中的这些特异致病菌所产生的毒物介导牙周组织破坏，造成牙周病的发生。

20世纪，微生物学家主要依赖细菌培养的方法，认为阿米巴或链球菌是牙周病的主要病原微生物。但是，随着越来越多的特异细菌被发现与牙周病相关，使以上结果遭到质疑。所以，20世纪30年代，大家认为，牙齿上所有的细菌都可能引起牙周病，细菌总量是造成牙周病发生和加重的原因。在强调细菌堆积是牙周病病因的时代，临床医生和研究者发现，一些口腔卫生很差的人在相当长的时期内不发生牙周病；而且，菌斑的大量堆积与牙周组织破坏（牙周炎）没有直接相关性。

1964年，Keyes和Jordan提出，在仓鼠中，如果把有牙周炎和没有牙周病的仓鼠关在一起，或者将从有牙周病的仓鼠中分离的黏性放线菌接种到没有患病的仓鼠口腔中，牙周病可以在仓鼠中传播。由于这个在仓鼠中牙周病感染和传播的研究结果，牙周病学领域发生改变，牙周微生物病因研究又开始致力于确定是否是一些特异致病菌，而不是龈下所有的细菌造成牙周病。

Socransky等最先致力于检测局限性青少年牙周炎牙周袋中细菌，他们比较了进行性骨吸收和深袋形成部位及邻近牙周健康部位的细菌，研究发现，进行性骨吸收的部位定植一种厌氧微需氧的革兰阴性菌——*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（过去的*Actinobacillus actinomycetemcomitans*），它们与在邻近健康部位大量发现的兼性革兰阳性微生物完全不同。以上发现引领了口腔微生物的黄金时代，特异菌斑学说得到一致认同，相关研究也因此集中在通过横向和纵向研究，鉴别和检测健康和疾病状态下的牙周特异致病菌上。横向研究则证实浅袋中的微生物群与深袋中的不同。接着，20世纪80年代的纵向研究的结果证实，一些特异细菌与牙周炎活动期进展部位相关。20世纪90年代，研究发现，在已知的500种口腔细菌中，只有一小部分细菌可造成牙周病。1996年，全球牙周病学研讨会上，专家们一致同意，伴放线聚集杆菌、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌（过去的*T. forsythensis*）和口腔密螺旋

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

体等四种细菌是牙周病的特异病原因子。根据 Koch 原则，与牙周炎相关的细菌还包括月形单胞菌、真杆菌、螺旋体、中间链球菌等。

二、内源性感染学说及外源性感染学说

关于牙周致病微生物的来源，牙周微生物界也经历了内源性感染、外源性感染和生态菌斑学说的认识过程。内源性感染的细菌来源于皮肤、鼻腔、口腔以及肠道、尿道的正常菌群。来自某部位的正常菌群可能引起其他器官系统致命的感染。在微生物术语中，口腔正常菌群，即固有微生物群（indigenous）是指各种利用培养和显微镜，在正常、健康个体的口腔表面上常常被发现的各种微生物类型。固有菌群常在疾病发生中有保护作用，它们介于共生（symbiosis）和致病菌之间。典型的固有微生物是寄生的而不是腐生的（non-saprophytic），且不具有公认的绝对的致病性。固有微生物群由正常菌群组成，当受到干扰后，会自身很快在稳定的生态系中重建。当固有细菌离开它们本身的定植微环境（在那里它们是不致病的，例如舌乳头等），在其他地方（如龈沟内）引起疾病的发生。固有细菌也可能在某些部位在一定条件下繁殖以及在菌群中比例大大增加，变得具有致病力。

20 世纪 50 年代和 60 年代，固有微生物却被认为是牙周疾病的主要病原因子。一些微生态学家通过无菌动物试验和常规动物模型揭示，口腔一些固有细菌比其他细菌具有更大的毒力，如放线菌引起牙周支持组织的破坏。20 世纪 70 年代纵向和横向研究的结果发现，从口腔内的众多微生物中寻找到的与牙周病相关的个别微生物（或几组微生物）具有两面性。它们一方面具有致病的可能性，但是另一方面并不是总是表达毒力。例如，牙龈卟啉单胞菌虽然被一致公认为慢性牙周炎的致病菌，但是，它却不总是在牙周病早期病损的微生物群中占主导地位，当疾病进展时也不总是表现为数量增加。以上提示，牙龈卟啉单胞菌可能不是牙周炎的始动因子，而是微生物群中能适应疾病状态的环境的结果，在这个环境中，牙龈卟啉单胞菌通过致病因子促进了牙周炎的进展。这与医学定义的病原菌不同：病原菌在宿主体内总是会致病。

在口腔卫生状况差的情况下，局部微生态的变化、局部或全身防御功能的改变造成口腔内以上细菌（即潜在的致病菌）比例的增加，这将造成牙周炎的发生，这样的感染实质上是条件致病菌感染。因此，有学者认为牙周病可能是条件致病。而且，微生物群中的“健康”成员可能通过代谢等生理活动具有改变微环境的能力，从而有利于更多的致病微生物进入微生物群。微生物群中的微生物与环境之间的关系就称微生态系。微生态系中微生物和环境的动力学改变可能增加微生态系的致病力，从而引起或促进牙周病的发生，这一系列的改变被 Marsh 称为“生态菌斑学说”。

一般认为，外源性感染的细菌一般在口腔里不存在。但是，在牙周微生物中，至少伴放线菌聚集杆菌和牙龈卟啉单胞菌被认为是外源性致病菌，两者在牙周健康者检测水平低，且已有研究证实以上两种细菌通过牙周病父母可能传染给子女。

（徐　屹）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第三节　牙周微生物

一、牙周微生物复合体

自 20 世纪 60 年代中期以来，随着微生物检测分析技术的不断革新，越来越多的研究证实很多感染性疾病其实是多种微生物或多细菌感染的结果，有些疾病还可表现为常驻微生物在敏感宿主体内的机会性感染。口腔是人体重要的微生物储库之一，已有研究报道口腔内存在着约 700 多种菌种。通过总结以往分析不同牙周状态群体龈下细菌微生态组成的研究结果后，目前学者们普遍认为：多种微生物复合形成的牙菌斑生物膜是疾病发生的始动因素。1998 年起，美国著名口腔微生物学家 SS. Socransky 和 AD. Haffajee 的研究团队在应用全基因 DNA 探针和 DNA-DNA 棋盘杂交技术比较了不同牙周状态群体龈下菌斑样本中常见细菌的类别和水平，并根据这些微生物群的定植和分布状态及与牙周病损的密切程度，将它们进行了归类和整理，提出了牙周微生物复合体(microbial complex)的概念。40 余种常见的龈下细菌被分为 6 个主要的微生物复合体，分别以红、橙、黄、绿、紫、蓝色来表示(图 12-3)。蓝色复合体(第六复合体)主要为放线菌属；紫色复合体(第五复合体)包括龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)和小韦荣菌(*Veillonella parvula*)。绿色复合体(第四复合体)包括：二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga spp.*)、简明弯曲菌(*Campylobacter concisus*)、啮蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)和伴放线菌聚集杆菌(*A. actinomycetemcomitans*)。黄色复合体(第三复合体)由链球菌属组成，包括：血链球菌(*Streptococcus sansguis*)、口腔链球菌(*Streptococcus oralis*)、缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、戈氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)等。目前认为以

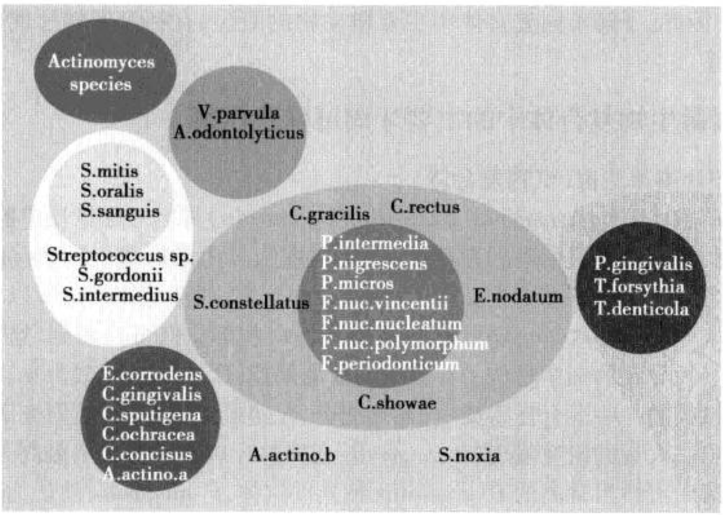


图 12-3　牙周龈下菌斑生物膜的 6 个主要微生物复合体(microbial complex)的模式图

注：图片来自：Sigmund S. Socransky, Annde D. Haffajee. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, 2005, 38: 135-187. P149, Fig 9

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

上复合体是龈下菌斑生物膜形成初期，涉及与宿主表面结构和配体相黏附的早期定植微生物群落。橙色复合体（第二复合体）包括：核梭杆菌属（*Fusobacterium spp.*）、普雷沃菌属（*Prevotella spp.*）、微小消化链球菌（*Peptostreptococcus micros*）、弯曲菌属（*Campylobacter spp.*）、真杆菌属（*Eubacterium spp.*）和星群链球菌（*Streptococcus constellatus*）。橙色复合体是与牙周炎紧密相关的核心群，这群微生物一方面可释放自身合成的小分子片段来“营养”菌斑中的其他微生物；同时，还能通过细菌表面结构与早期定植的细菌以及后期定植的红色复合体相结合，因此被认为在龈下菌斑生物膜的成熟过程中发挥了“桥梁”作用。最后，与牙周病发生发展最为密切的细菌群落为红色复合体（第一复合体），包括牙龈卟啉单胞菌（*P. gingivalis*）、福赛斯坦纳菌（*T. forsythia*）和齿垢密螺旋体（*Treponema denticola*）。红色复合体的细菌常一起存在，并且分布于整个龈下菌斑生物膜中与牙周袋上皮相比邻的结构松散的最外层。红色复合体细菌数量的增加常与牙周病相关临床指标的增加密切相关。6 种牙周微生物复合体在龈下菌斑中的分布情况详见图 12-4 所示。牙周微生物复合体的变化常与牙周病的发生发展、治疗和转归密切相关，因此，了解不同复合体中主要微生物的简况，有利于理解牙周微生态变化与牙周状况的关系。



图 12-4　不同牙周微生物复合体在龈下菌斑生物膜中分布模式图

注：Sigmund S Socransky, Annde D Haffajee. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, 2005, 38: 135-187. P150, Fig 10

二、牙周微生物复合体中的主要牙周可疑致病菌

（一）牙龈卟啉单胞菌（红色复合体）

牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*）原名牙龈紫质单胞菌，是一种革兰阴性、不解糖、能够产生黑色素的专性厌氧菌，菌细胞多为球杆状。*P. gingivalis* 的生长要求严格的厌氧条件和一些特殊的生长因子，如氯化血红素、维生素 K_1 等，所以在正常口腔中的主要定植生境是龈沟。*P. gingivalis* 在唾液及其他口腔部位偶可检测到，这可能是源于唾液及龈沟液的流动导致的细菌易位。在健康的牙周部位，*P. gingivalis* 较少见，也未见明显的致病性。而在口腔的一些混合性感染中，如牙周炎、牙髓根尖周感染、冠周炎等，牙龈卟啉单胞菌均能被检出。大量的研究发现，*P. gingivalis* 在慢性牙周炎中检出率最高，并在成人慢性牙周炎患者血清中可检出升高的 *P. gingivalis* 特异性抗体，*P. gingivalis* 被认为是慢性牙周炎的主要可疑病原菌，属于红色复合体。*P. gingivalis* 在人群中的分布特点是很少在儿童的口腔中检出。但随着年龄的增长，在青春期及成年期的口腔中检出率逐渐增高。一些全身因素如糖尿病或吸烟等，也可导致相关人群 *P. gingivalis* 携带率的升高。相关内容将在本章第五节深入讨论。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

P. gingivalis 与牙周炎相关性的研究，证实了该菌是慢性牙周炎的主要可疑病原菌。其致病作用证据为：①*P. gingivalis* 在慢性牙周炎的检出率和检出数量明显高于健康牙周和牙龈炎；在活动性病灶位点增多。②*P. gingivalis* 可迅速黏附和侵入多种宿主细胞，包括牙龈上皮细胞、牙龈成纤维细胞、血管内皮细胞等，侵入的细菌不仅能在宿主细胞内繁殖和存活，躲避宿主免疫防御系统的攻击。还可通过调节细胞自吞噬循环通路（endocytic recycling pathway）来逃离原驻细胞，侵入邻近未感染细胞，造成感染的扩散。③成人牙周炎患者血清及龈沟液中，发现升高的与该菌相应的特异抗体水平。④在自然发生或丝线结扎以诱导牙周疾病的动物实验中，该菌成功地诱导了牙周炎动物模型。⑤该菌具有多种毒性因子，其致病力均被大量研究证实。

在龈下微生态环境中定植是 *P. gingivalis* 发挥致病作用的前提。在不断的演化过程中，*P. gingivalis* 形成了许多与龈下菌斑生物膜中其他细菌共聚、与宿主成分黏附的表面结构和毒性成分（表 12-1、表 12-2）。*P. gingivalis* 的菌毛几乎参与了 *P. gingivalis* 与其他微生物和宿主黏附接触的所有过程。*P. gingivalis* 菌毛包括由 *fimA* 基因编码的主要菌毛（major fimbriae）和 *mfa* 基因编码的次要菌毛（minor fimbriae）。这些菌毛结构为丝状的多聚蛋白复合体，覆盖在细菌表面并从外膜中延伸出来。研究显示：*P. gingivalis* 的菌毛可与早期定植的黏性放线菌、戈氏链球菌和轻链球菌等相黏附结合。*P. gingivalis* 表面的一种分子量为 40kDa 的外膜蛋白能与黏性放线菌、戈氏链球菌共聚；口腔链球菌的甘油醛-3-磷酸盐脱氢酶能与 Pg 菌毛共聚。此外，*P. gingivalis* 可与 *F. nucleatum* 这一菌斑生物膜形成过程中的重要桥梁细菌发生非常强烈的特异性共聚作用。这一相互作用不仅有利于 *P. gingivalis* 的定植，还能帮助其在有氧环境中存活。另有研究还证实了 *P. gingivalis* 与 *P. intermedia*、*T. denticola*、*T. forsythia* 等共聚过程中菌毛的重要性。并不是所有的 *P. gingivalis* 表面都有菌毛这一结构，例如 *P. gingivalis* ATCC33277 和 *P. gingivalis* W50 就存在一定的表面结构差异。因此，除菌毛依赖型黏附外，*P. gingivalis* 的黏附可包括了由牙龈素、血凝素等介导的非菌毛依赖型黏附，详见表 12-1。

表 12-1　牙龈卟啉单胞菌的主要黏附素

细菌黏附素	分泌机制	受　体
• 长菌毛（FimA）	脂蛋白依赖型	详见表 12-2
• 短菌毛（Mfa）	脂蛋白依赖型	详见表 12-2
• 牙龈素复合体，RgpA 和 Kgp 的黏附结构域	病原菌自转运旁路？	纤维蛋白原，纤连蛋白，层粘连蛋白，V 型胶原，红细胞（血凝素），上皮细胞，成纤维细胞
• Kgp 蛋白水解域	病原菌自转运旁路？	血红蛋白
• 血红蛋白受体蛋白（HbR）	病原菌自转运旁路？	血红蛋白
• HagA、B、C、D、E	病原菌自转运旁路？	红细胞（血凝素）
• 氯化血红素结合蛋白 35（HBP35 40kDa Omo）	病原菌自转运旁路？	氯化血红素，血凝素 黏性放线菌 革氏链球菌

注：资料引自：ATSUO AMANO. Bacterial adhesions to host components in periodontitis. Periodontology 2000，2010，52：12-37. P17，Tab. 1

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表 12-2　牙龈卟啉单胞菌长(FimA)和短(Mfa)菌毛识别的受体蛋白

蛋　　白	亲和力 Ka(1/M)	菌株(FimA 基因型)
• 唾液成分		
富酪蛋白	1.48×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
富脯糖蛋白	1.62×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
富脯蛋白	1.63×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
• 细胞外基质蛋白		
层粘连蛋白	2.15×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
纤连蛋白	2.16×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
纤维蛋白原	2.16×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
血小板反应蛋白	2.26×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
Ⅰ型胶原	2.76×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
弹性蛋白	3.08×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
玻连蛋白	3.79×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
• 乳铁蛋白		381(Type Ⅰ FimA)
• 血红蛋白	2.43×10^{6}	33277(Type Ⅰ FimA)
• 抗菌毛 IgG	1.22×10^{7}	33277(Type Ⅰ FimA)
• α5β1-整合素	9.32×10^{4}	33277(Type Ⅰ FimA)
	1.51×10^{7}	OMZ314(Type Ⅱ FimA)
• 补体受体(β2-整合素;CD11B/CD18)		381(Type Ⅰ FimA) 33277(Type Ⅰ FimA) 33277(Fim CDE)
• αvβ3-整合素		33277(Type Ⅰ FimA)
• CXC 趋化因子受体 4		33277(Type Ⅰ FimA)
• Toll 样受体 2		381(Type Ⅰ FimA)
	3.46×10^{7}	381(Type Ⅰ FimA) 33277(Mfa)
	1.62×10^{7}	381(Mfa)
• CD14		381(FimA and Mfa)
脂筏		33277(Type Ⅰ FimA) TDC60(Type Ⅱ FimA)
• 细胞内黏附分子 1		381(Type Ⅰ FimA)
• 甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)		381(Type Ⅰ FimA)
• 细胞角蛋白		381(Type Ⅰ FimA)
• 其他口腔微生物成分		
Dentilisin(齿垢密螺旋体)		381(Type Ⅰ FimA)
GAPDH(口腔链球菌)		33277(Type Ⅰ FimA)
SspB(戈氏链球菌)		33277(Mfa)

注:资料引自:ATSUO AMANO. Bacterial adhesions to host components in periodontitis. Periodontology 2000,2010,52:12-37. P17,Tab. 1

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

牙龈卟啉单胞菌形成了种类繁多的致病因子，利用这些毒力成分在牙周病发生发展的不同环节发挥着各种各样的致病作用。近年来，随着全基因组、蛋白质组和代谢组学研究技术的发展，很多以前未知的结构或蛋白分子也被发现可能具有潜在的致病作用。最近，美国Forsyth研究中心建立了有关 *P. gingivalis* 毒力作用和编码基因的研究计划（*Porphyromonas gingivalis* Genome Project），相关网站的数据可以为全世界研究 *P. gingivalis* 的学者所分享，网址为：http://www.pgingivalis.org/。目前，可以检索到的 *P. gingivalis* 致病机制相关研究文章的数量十分庞大，仅综述性文章就数以万计。介于篇幅的原因，不一一赘述。相关的主要毒力因子和可能的致病机制详见表12-3。部分致病机制的研究结果还可见本章第四、第五节内容。

表12-3　牙龈卟啉单胞菌主要的毒性因子和相关致病机制

主要毒力因子	相关致病机制
内毒素、牙龈素（胰酶样蛋白酶）、胶原酶、纤溶酶、其他蛋白酶、磷脂酶A、血凝素、菌毛、荚膜、外膜囊泡、植物凝集素、吲哚、有机酸等代谢终末产物、降解免疫球蛋白、成纤维细胞抑制因子等	1. 通过黏附、共聚作用定植在龈下微环境中，并进一步侵入牙周结缔组织深部 2. 抵抗宿主先天性和获得性免疫防御反应，干扰宿主细胞正常的细胞周期和生理功能 3. 通过自身分泌毒力因子或促进宿主细胞分泌前炎症介质和趋化因子，引起牙周组织水解破坏 4. 通过血液循环直接到达远端器官，或通过免疫炎症反应，直接或间接促进其他系统性疾病的发展。例如：心血管疾病、糖尿病、呼吸系统疾病、早产和低体重新生儿等

（二）福赛斯坦纳菌（红色复合体）

福赛斯坦纳菌（*Tannerella forsythia*，*T. forsythia*）曾被命名为福赛斯拟杆菌（*Bacteroides forsythus*）是由美国Forsyth Institute的Tanner等从活动性重度牙周炎患者的口腔中分离获得。为革兰阴性、无芽胞、无动力、不解糖、厌氧的梭形球杆菌。Sakamoto等应用16S rDNA分析发现：*B. forsythus* 不属于拟杆菌属，其具有特异的限制性脂肪酸和其他大分子成分，应该是一种新的细菌种属，因此随后更名为 *Tannerella forsythia*。*T. forsythia* 的培养条件非常严苛，需要海明、维生素K、L-半胱氨酸和N-乙酰胞壁酸的营养支持，要求培养7～14天方能形成小的菌落。因此，其培养的困难性导致目前对这种细菌的研究还很欠缺。

T. forsythia 常分离自牙周炎患者病变活动位点的龈下菌斑，随着牙周袋深度的增加，其数量明显增多，并且在BOP(+)的位点 *T. forsythia* 的水平也显著升高。Tanner等最近的研究再次证实了 *T. forsythia* 在舌和龈下的分布情况与牙周炎发生发展存在相关关系。很多研究发现：*T. forsythia* 常与红色复合体的另外两种牙周致病菌共存。*P. gingivalis* 能通过菌毛和牙龈素与 *T. forsythia* 共聚，*T. denticola* 的LrrA蛋白能通过与 *T. forsythia* 的BspA蛋白的N-末端结构域结合而发生共聚。最近的研究发现，*T. forsythia* 还具有与约翰逊黄杆菌（*Flavobacterium johnsoniae*）滑行运动相关脂蛋白的编码基因 *gldH* 基因相似的同源基因，提示这种蛋白可能也参与了 *T. forsythia* 与其他龈下微生物的共聚结合过程。*T. forsythia* 与 *F. nucleatum* 也具有共生关系，与 *F. nucleatum* 联合培养可增加 *T. forsythia* 的生长能力，*F. nucleatum* 可能

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

提供了 *T. forsythia* 生长必需的 N-乙酰胞壁酸。

研究显示，*T. forsythia* 可分泌多种蛋白酶，例如：具有胰酶样活性、可降解多苯甲酰-DL-精氨酸-β-萘酰胺（BANA）的肽酶；由 *PrtH* 基因编码的分子量为478kDa 的蛋白酶；以及由 *sia HI* 基因编码的唾液酸酶。其中唾液酸酶是 Ishikura 等从 *T. forsythia* ATCC43037 中克隆获得的。Grossi 等发现从病变位点牙周组织中分离的拟杆菌属与健康位点分离细菌相比，能够产生更多的唾液酸酶。唾液酸酶存在于包括细菌、真菌、病毒和支原体等多种微生物中，能够裂解在唾液酸与宿主糖蛋白、糖脂等的糖基间结合所关键的 α-酮苷键。唾液酸酶不仅与 *T. forsythia* 破坏宿主牙周组织相关，还可能参与 *T. forsythia* 代谢 N-乙酰胞壁酸的过程。Hughes 等（2003）通过扫描 *T. forsythia* ATCC43037 的基因库，发现了编码 α-D-葡糖苷酶和 N-乙酰-β-氨基葡糖苷酶的两种糖苷酶基因。这些基因编码的糖苷酶与 *P. gingivalis* 的某些酶具有相似性，都能够破坏牙周袋基底膜的完整性。而在龈炎和牙周炎患者的龈沟液中检测到的糖苷酶活性就显著高于牙周健康者。

细胞信封脂蛋白结构在革兰阴性细菌的致病活性中扮演重要的角色。研究发现：*T. forsythia* 也能产生类似的信封蛋白 BfLP。BfLP 能够刺激牙龈成纤维细胞产生 IL-6 和 TNF-α；活化成纤维细胞和 THP-1 细胞的 NF-κB 信号通路；并且激活 caspase-8 启动的凋亡过程，提示：*T. forsythia* 的信封脂蛋白 BfLP 可能是其促进牙周组织破坏的重要致病因子。此外，*T. forsythia* 还具有另一种特殊的致病结构——S-层（S-layer）。S-层是一种细菌信封结构外表面的附加超表层，由规则排列的糖蛋白亚单位组成，具有晶状体蛋白和糖蛋白。S-层在保护细菌抵御外界因素攻击时十分重要。*T. forsythia* 的 S-层最早由 Kerosue 等鉴定分离出来，是一层锯齿状结构的亚单位，约 10nm 厚。不同的课题组从 *T. forsythia* ATCC43037 表面获得了两种 S-层蛋白，分别为 200/210kDa 的 S-层蛋白和 270/230kDa 的 S-层蛋白。研究显示：S-层蛋白具有很强的抗原性，能够介导 *T. forsythia* 的血凝作用，并参与 *T. forsythia* 的黏附和识别过程，协助其侵入 KB 细胞。在慢性和侵袭性牙周炎患者的血清中 *T. forsythia* S-层的 IgG 显著高于健康者。Sabet 等应用 *T. forsythia* 的 S-层蛋白还成功构建了大鼠的皮下脓肿模型。

T. forsythia 致大鼠皮下脓肿模型的研究发现，*T. forsythia* 不仅具有导致脓肿破坏的能力，还与 *P. gingivalis* 具有协同作用，两者的混合菌液所导致的感染和病损程度显著增高，且这种协同作用与 *P. gingivalis* 的 RgP 和 KgP 的蛋白水解活性相关。深入研究显示：*T. forsythia* 的致脓肿作用可能与 *bspA* 基因编码的 BspA 蛋白有关。BspA 蛋白为一种 *T. forsythia* 菌体表面的分子量为98kDa 的富亮氨酸重复蛋白，最早由 Honma 鉴定并分离获得。通过比较 *bspA* 基因缺陷株和野生株的黏附能力发现：BspA 蛋白涉及了细菌对宿主纤连蛋白和层黏连蛋白的黏附。BspA 还具有很强的免疫原性。其结构域的 606～706 残基具有与 *P. gingivalis* 菌毛结构中能诱导宿主细胞因子分泌的结构域类似的结构，这一相似结构也在铜绿假单胞菌中被发现，且已证实能够诱导外周血单核-巨噬细胞产生大量的前炎症介质。

（三）齿垢密螺旋体（红色复合体）

齿垢密螺旋体（*Treponema denticola*，*T. denticola*）是口腔密螺旋体属的一种。早在 350 年前，荷兰著名微生物学家 Van Leeuwenhoek 就第一次通过自制显微镜，在来源于牙面软垢中观察到了这种螺旋状的微生物。*T. denticola* 是一种具有细长螺旋结构、运动活泼的革兰阴

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

性细菌。表面存在轴丝样的鞭毛结构。这些胞质周鞭毛起自细菌的两极，并在菌体中间重叠，与细菌的螺旋形态和运动性密切相关。*T. denticola* 通过电子显微镜观察时与革兰阴性菌的菌体表面非常类似，化学分析显示，*T. denticola* 的外壳脂质中缺乏革兰阴性细菌 LPS 的经典组成成分：3-脱氧-辛酮糖酸（3-deoxymanno-octulosonic acid）、庚糖和 β-脱氧脂肪酸。外膜中的脂肪酸含量也显著低于 LPS。相反，*T. denticola* 的外壳脂质主要由糖脂组成，富含等距的反异脂肪酸，因此，*T. denticola* 的外壳与革兰阳性细菌的脂磷壁酸存在化学结构的相似性，但却具有革兰阴性细菌脂多糖的类似功能。

早在 19 世纪末，学者们就发现急性坏死性溃疡性龈炎患者病灶位活检组织中存在大量增殖的螺旋体。1982 年，Armitage GC 和他的研究团队第一次将螺旋体与牙周炎系统性联系在了一起。他们的研究显示龈下螺旋体的检出率与菌斑指数、龈沟液量、牙周探诊深度、探诊出血、牙周附着丧失具有显著的正相关性。1984 年，Forsyth 牙科中心通过分析 184 名牙周健康者和 591 名慢性牙周炎患者的龈下菌斑样本，详细描述了 *T. denticola* 数量与牙周袋深度的关系。随后的大量研究也证实：*T. denticola* 的分布和检出量在牙周健康者少见，而随着牙周炎症的加重显著增加；牙周治疗可显著降低 *T. denticola* 的数量。

在龈下微生态环境中，*T. denticola* 可与其他微生物（特别是 *P. gingivalis* 和 *F. nucleatum*）共聚结合。*T. denticola* 的 *lrrA* 基因编码一组富含亮氨酸重复单位的蛋白。LrrA 蛋白与 *T. denticola* 的细胞外胞质形态密切相关。能够帮助其与红色复合体其他微生物的共聚。*T. denticola* 的类糜蛋白酶（chymotrypsin like protease complex，CTLP），又称为 dentilisin，也是 *T. denticola* 与 *P. gingivalis* 菌毛共聚结合的重要连接蛋白。研究显示：当将 *T. denticola* 与 *P. gingivalis* 在体外共培养时，两者可互相黏附，形成一层稳固的生物膜样结构，且两种细菌相互黏附的数量也稳定在 1∶6的比率。另有研究显示：*T. denticola* 与 *P. gingivalis* 常伴随出现在严重牙周病损位点的龈下菌斑生物膜中，增加了牙周治疗的难度。深入的研究证明，这些活动力强的栖牙密螺旋体还可黏附于宿主组织蛋白表面，并侵入宿主细胞。而 *T. denticola* 的多种毒力因子（如外膜蛋白、酶类等）在这一过程中发挥重要作用。

大量研究证实，*T. denticola* 等产生一系列主要外膜表面蛋白（main surface protein，MSP）和多极的小分子肽段来介导细菌与宿主蛋白和细胞的黏附。这些外膜蛋白可通过凝血素样蛋白与宿主细胞结合。*T. denticola* 的一种主要外膜蛋白的分子量约为 64kDa 大小，研究显示其能与 Hela 细胞表面分子量为 65kDa 的脂蛋白结合，通过改变 β1 整合素的状态，进而诱导肌动蛋白丝状组间的重排，这种鞘蛋白能够插入细胞膜导致细胞去极化，形成大的非选择性膜通道，导致钙离子流快速流入细胞内部。*T. denticola* 的一种分子量为 70kDa 多极肽片段还能够与纤连蛋白和血纤维蛋白溶酶原结合，促进其与宿主细胞的黏附。其他研究还证实 *T. denticola* 具有黏附层粘连蛋白、肝素、Ⅰ/Ⅳ/Ⅴ型胶原等的能力。

除外膜蛋白之外，*T. denticola* 还可产生多种与外膜有关的肽酶，其中一种最为重要的酶为脯氨酰-苯基丙氨酸特异性蛋白酶。Uitto 等最早鉴定该酶为一种糜蛋白酶样蛋白酶。该酶蛋白随后被层析分成了 3 种成分，其中 72kDa 的蛋白经过基因测序后显示与枯草芽胞杆菌的枯草杆菌蛋白酶（subtilisin）具有同源性。Ishihara 等（1996）将其命名为蛋白酶 dentilisin。dentilisin 具有糜蛋白酶样作用，能够降解糜蛋白酶作用底物 SAAPNA。其酶活性最适 pH 值约为 7.5，具有相对热稳定性，于 55℃ 加热 1 小时活性丧失 90%，于 60℃ 加热则活性完全丧失。糜蛋白酶样蛋白酶 dentilisin 不仅能够介导 *T. denticola* 与宿主细胞和蛋白成

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

分的黏附，还能够降解多种组织蛋白，如铁传递蛋白（transferring）、纤维蛋白原、α1 抗胰蛋白酶（α1-antitrypsin）、免疫球蛋白 A（immunoglobulin A）、免疫球蛋白 G（immunoglobulin G）、明胶（gelatin）、牛血清清蛋白（bovine serum albumin）、纤维连接蛋白、Ⅳ型胶原、层粘连蛋白（laminin）等，灭活多种生物活性肽，造成细胞外基质的崩解、组织结构和功能的紊乱，破坏组织的稳态平衡。研究发现：dentilisin 可以通过降解破坏上皮细胞间连接、增加上皮细胞层的通透性，来协助 *T. denticola* 穿透牙周组织上皮基底膜，侵入结缔组织深部。苗棣等的研究显示：*T. denticola* 的类糜蛋白酶基因缺陷株无法诱导牙周膜成纤维细胞 MMP-2 的激活和纤维连接蛋白的降解，提示：*T. denticola* 的 dentilisin 介导了牙周膜细胞的基质金属蛋白酶-2 依赖性纤维连接蛋白的降解。*T. denticola* 的 dentilisin 还能够激活胶原酶 MMP-1 和 MMP-8，从而引发对胶原的降解，并刺激外周血单核-巨噬细胞、脐静脉内皮细胞等分泌前炎症细胞因子和趋化因子，引发宿主免疫调控紊乱，参与了牙周炎症的发生发展。

T. denticola 的另一种重要蛋白酶为 cystalysin，由 Chu 等发现并命名。Cystalysin 是一种存在于 *T. denticola* 细胞质中的分子量为 46kDa 的蛋白，具有吡哆醛 5'磷酸盐依赖型氨基转移酶家族样结构，功能类似 L-半胱氨酸脱巯基酶。Cystalysin 能够利用宿主的磺酰类分子合成并释放丙酮酸盐、NH_3、H_2S 等，有利于 *T. denticola* 生长。Cystalysin 可以从 *T. denticola* 的胞质中转移出来，与红细胞相互作用，通过分解半胱氨酸为 H_2S 或利用半胱氨酸形成硫烷-硫黄衍生物（sulfane-sulfur derivatives）这种强氧化剂，来与红细胞膜结合，导致细胞膜稳定性降低、细胞损伤甚至死亡。Cystalysin 还可通过降解谷胱甘肽等产生多种对牙周组织具有毒性作用的代谢终末产物，参与牙周结缔组织的水解破坏。

Greene 和 Stamm（2000）成功鉴定了 *T. denticola* 的一组趋化基因簇。这一基因簇包括 3 种趋化基因：*cheA*、*cheW* 和 *cheY*。其开放阅读框架与梅毒螺旋体和疏螺旋体具有同源性。*T. denticola* CheA 和 CheY 蛋白的主要结构域与大肠埃希菌的 CheA 和 CheY 蛋白也高度一致。Li 等也发现了 *T. denticola* 的另一种趋化蛋白产物，*dmcB* 基因编码的甲基接受趋化蛋白（methyl-accepting chemotaxis protein）。

（四）普雷沃菌属（橙色复合体）

中间普雷沃菌（*Prevotella intermedia*）和变黑普雷沃菌（*Prevotella nigrescens*）同属普雷沃菌属，为革兰阴性、无芽胞、无动力的产黑色素的解糖的厌氧杆菌。

在牙周病原菌研究中发现，中间普雷沃菌在妊娠期龈炎中有较高的检出率，是妊娠期龈炎的主要病原菌，原因可能与该菌可利用雌二醇和孕激素有关，具体内容详见本章第五节。此外，*P. intermedia* 在急性坏死性溃疡性龈炎中检出率和检出量均有所升高，并可在其他类型的牙周炎、龈炎及口腔多种混合菌感染中分离到。*P. intermedia* 的致病性与牙龈卟啉单胞菌有一定的相似性，包括动物模型上诱导混合感染，患者血清抗体水平升高，产生脂肪酸、吲哚、硫化氢，产生多种蛋白酶，抑制中性粒细胞的趋化作用和巨噬细胞的吞噬力等方面。

（五）具核梭杆菌属（橙色复合体）

具核梭杆菌（*Fusobacterium nucleatum*）是革兰阴性、无芽胞、不解糖或弱发酵碳水化合物的梭形厌氧杆菌。*F. nucleatum* 是口腔常见细菌之一，主要在龈缘和龈下菌斑定植。该菌在牙周病灶位点较健康牙周有更高的检出率和检出量，可在慢性牙周炎、侵袭性牙周炎、牙龈炎、牙髓根尖周感染、颌面部牙源性感染中检出。*F. nucleatum* 产生的脂肪酸、NH_3、吲哚、

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

H_2S（为该菌产生明显恶臭的原因）、内毒素，可抑制成纤维细胞增殖、诱导巨噬细胞产生 IL-1，与牙龈卟啉单胞菌产生明显的共聚反应。

（六）弯曲菌属（橙色复合体）

直肠弯曲菌（*Campylobacter rectus*）是革兰阴性、厌氧、短而可动的弧菌。该菌利用 H_2S 或甲酸盐作为能源。与健康部位比较，*C. rectus* 在疾病和活动性牙周病灶部位有更高的数量。在成功治疗后，该菌的检出率降低、数量减少。在牙周病患者的难治性病灶位点，*C. rectus*常常和其他可疑牙周病菌一起被检出。*C. rectus* 与伴放线菌聚集杆菌一样，可产生白细胞毒素。

（七）真杆菌属（橙色复合体）

真杆菌是革兰阳性、严格厌氧的不规则杆菌，被认为可能与牙周病有关。从牙周龈下菌斑中分离的优杆菌有缠结真杆菌、短真杆菌、胆怯真杆菌。真杆菌的分类培养，特别是初代培养，常常是比较困难的，可能因为真杆菌对氧较敏感的原因。滚管法更较血琼脂平皿法能提高其检出率。由于真杆菌培养的困难，所以对其毒性因子和致病性的讨论还不多见。因为该菌在牙周袋内被检出，而且在不同类型的破坏性牙周炎个体可发现特异抗体水平的升高等特点，研究者们将其列为牙周可疑病原菌。

（八）伴放线菌聚集杆菌（黄色复合体）

伴放线菌聚集杆菌（*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*）是一种革兰阴性、嗜二氧化碳的、解糖的、无动力的、末端圆形的小杆菌。1976 年，Newman 和 slots 首次报道该菌在牙周病，特别是局限性青少年牙周炎（localized juvenile periodontitis，LJP）（局限性侵袭性牙周炎的早期命名）病灶有较高的检出率和检出量。伴放线菌聚集杆菌还与嗜血菌属（*Haemophilus*）、放线杆菌（*Actinobacillus*）、心杆菌属（*Cardiobacterium*）、艾肯菌属（*Eikenella*）和金氏菌属（*Kingella*）共同组成能导致感染性心内膜炎的 HACEK 革兰阴性致病菌群。Dirienzo 等报道该菌有 15 种基因型，从健康者口腔中常可分离到Ⅷ和Ⅸ 2 种基因型，而从青少年牙周炎（侵袭性牙周炎的早期命名）家族分离出Ⅱ、Ⅳ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅴ和Ⅵ 6 种基因型；根据生化反应，伴放线菌聚集杆菌可分为 10 个生物型；根据其表面抗原和热稳定性，可分为 a、b、c、d 和 e 5 个血清亚型。

流行病学调查表明，伴放线菌聚集杆菌是口腔的正常菌群成员，牙的萌出和龈沟的形成为该菌的定植提供了生境和生存条件。目前已鉴定出与伴放线菌聚集杆菌黏附和定植于口腔内环境相关的多种黏附分子（表 12-4）。其中介导伴放线菌聚集杆菌与口腔黏膜黏附的主要由自运转体黏附素 ApiA 和 Aae 介导的特异性黏附方式完成，而伴放线菌聚集杆菌与牙面硬组织的黏附则主要由 Flp 等通过非特异性黏附实现。Fine 等的最新研究显示：伴放线菌聚集杆菌与放线菌属、链球菌属一样，都属于牙面早期的定植细菌，牙面清洁后的 6 小时之内就可检测到伴放线菌聚集杆菌的再次定植，而颊黏膜细胞是伴放线菌聚集杆菌再定植牙体硬组织表面的重要储库。

伴放线菌聚集杆菌被认为是局限性侵袭性牙周炎的主要病原菌。在健康牙周人群中可检出该菌的特异性抗体，但阳性率较慢性牙周炎、特别是局限性侵袭性牙周炎患者低。Zambon 等的早期研究显示青少年牙周炎患者伴放线菌聚集杆菌的检出率高达 97%，而健康或患有牙周炎的成人检出率小于 25%。定植了伴放线菌聚集杆菌的牙周健康儿童在长达 2 年的随访中都出现了牙槽骨的丧失和牙周炎的发生。随后的研究陆续为判定伴放线菌聚集

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表 12-4 伴放线菌聚集杆菌的主要黏附素

细菌黏附素	分泌机制	受 体
• Flp1 菌毛(*flp1*)	Ⅳ型菌毛蛋白(Tad 分泌系统)	自凝集 唾液,羟基磷灰石珠
• EmaA	病原菌自转运体(Ⅴc 型)	人颊及牙龈上皮细胞 上皮细胞(Hela 细胞)
• ApiA(Omp 100)	未鉴定	人颊上皮细胞 上皮细胞(Hela 细胞) Ⅱ型、Ⅲ型和Ⅴ型胶原 纤连蛋白
• 多聚糖		
SPAa,PGA	未鉴定	生物膜形成
O-多聚糖	未鉴定	梭菌属

注:资料引自:ATSUO AMANO. Bacterial adhesions to host components in periodontitis. Periodontology 2000,2010,52:12-37. P17,Tab. 1

杆菌为侵袭性牙周炎可疑致病菌提供了证据:①在活动性局限性侵袭性牙周炎患者中,该菌的检出率和检出数量明显高于牙周健康个体以及其他类型的牙周炎患者;②局限性侵袭性牙周炎患者血清中该菌的特异性抗体水平明显升高,而正常个体及其他类型的牙周炎患者未见此反应或为低水平的抗体;③伴放线菌聚集杆菌可产生多种破坏牙周组织的毒性因子;④伴放线菌聚集杆菌可侵入局限性侵袭性牙周炎患者的牙龈上皮细胞和结缔组织;⑤复发性(顽固性)病例的病灶位,发现藏匿的伴放线菌聚集杆菌;⑥伴放线菌聚集杆菌在悉生鼠可诱导疾病和表皮下脓肿;⑦成功的治疗可清除或抑制伴放线菌聚集杆菌的生长。

伴放线菌聚集杆菌可产生多种毒力因子,黏附蛋白、生物膜多糖基质、LPS、肽聚糖相关脂蛋白(peptidoglycan-associated lipoprotein)、诱导产生骨吸收因子、成纤维细胞有丝分裂抑制因子、白细胞趋化抑制因子、酸性和碱性磷酸酶、胶原酶和分泌毒素。其中 2 种分泌毒素——白细胞毒素(leukotoxin)和细胞膨胀致死毒素(cytolethal distending toxin,CDT)在细菌免疫逃逸中扮演重要的角色。

白细胞毒素是一种对高温和蛋白酶敏感的、相对分子质量为 1.15×10^5、能够导致淋巴细胞死亡的蛋白质。最早由 Baehni 等(1979)报道,Tsai 等最早分离获得 Ltx 蛋白。LTX 是由一个多基因的操纵子编码,包括 4 个已知基因:*ltxC*、*ltxA*、*ltxB* 和 *ltxD*。其中 *ltxA* 编码的毒素 LtxA 蛋白大小为 113kDa,与大肠埃希菌的 α-溶血素约有 51% 的氨基酸一致,与溶血曼海姆菌(*Mannheimia haemolytica*)的白细胞毒素约 43% 一致。LtxA 与激活白细胞毒素的分泌有关。LtxA 的毒素水平在不同的菌株之间存在着差异,学者们将其称为高毒株(JP2 菌株)和低毒株(652 菌株)。高白细胞毒素菌株能够产生更多的 LtxA 蛋白和 ltxA mRNA。流行病学调查也显示 LtxA 的毒素水平与牙周炎症程度相关。高白细胞毒素水平菌株在牙周严重破坏的个体中更容易检测到。最近在摩洛哥完成的一项研究发现:定植了 JP2 菌株的个体发生牙周附着丧失的情况比 652 菌株的个体更为严重。研究者指出,启动子特殊序列控制或影响细菌 LTX 的表达。高毒素菌株在启动子区域的 3'末端缺失了约 530bp 的碱基区域,这一区域的缺失与高水平的 LTX 产量有关,即 530bp 缺失是高毒性血清 b 型菌株的特征。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

Schaeffer 等的最近研究还发现:转座酶启动子和 *ltxC* 上游开放阅读框架编码的蛋白在 *ltxA* 操纵子的转录过程中也扮演重要角色,可能与 LtxA 过表达有关。LtxA 可被直接释放至细菌培养基中,也可通过核酸酶的作用存在于细菌细胞壁脂质外膜层中。Inoue 等发现将伴放线菌聚集杆菌培养在果糖恒化器中可导致细菌 LtxA 的生成水平下降,细菌内 cAMP 水平降低。另有研究发现磷酸转移酶系统(PTS)缺失的伴放线菌聚集杆菌菌株产生 LtxA 的水平显著低于 PTS 未缺失的野生株,而 PTS 是将磷酸盐转化为糖、生成 cAMP 的重要酶系统。提示:糖酵解过程可调节伴放线菌聚集杆菌的 LtxA 合成。免疫细胞表面的白细胞功能抗原 1(leukocyte function antigen-1,LFA-1)是免疫细胞与 LtxA 结合的配体。而 LtxA 主要与 LFA-1 的 CD11a 和 CD18 相结合。LFA-1 的主要功能为在感染的过程中介导白细胞对血管内皮细胞的黏附,并帮助白细胞穿过血管内皮到达感染局部。LFA-1 具有静止状态和活性状态下的两种结构。静止状态时,LFA-1 隐藏在细胞表面不与其他识别分子结合。当细胞被细胞因子激活后,LFA-1 变为黏附活性域样结构与 LtxA 结合,并黏附活化天然配体 ICAM-1 介导免疫细胞穿过血管壁。Fong 等的研究显示 LtxA 可首先改变宿主细胞内的钙离子浓度,升高的钙离子通过活化钙蛋白酶、裂解 LFA-1 踝蛋白,使 LFA-1 从静止状态改变为活化状态。随后 LFA-1 与 LtxA 结合,引起下游整合素信号通路的激活。

1998 年,Johnson 和 Lior 首次在大肠埃希菌和弯曲菌属中发现可使中国仓鼠卵巢细胞缓慢膨胀死亡的细胞膨胀致死毒素。CDT 是一组热不稳定蛋白,能引起宿主细胞发生细胞周期阻滞和进行性细胞膨胀,导致细胞核肿胀、染色体断裂,引起细胞死亡。1998 年,Sugai 等首先报道伴放线菌聚集杆菌也能产生 CDT 蛋白。随后的研究发现伴放线菌聚集杆菌 CDT 编码基因序列与致病性大肠埃希菌 cdtABC 具有 90% 的一致性;伴放线菌聚集杆菌产生的免疫抑制蛋白与 *H. ducreyi* 的 CdtB 蛋白同源性高达 94%。这一 CDT 蛋白同样可引起淋巴细胞 G2 周期阻滞,是伴放线菌聚集杆菌逃避宿主免疫、参与疾病进程的重要因子。CDT 是由不同亚单位构成的三聚体,分别由 3 个基因操纵子 *cdtA*、*cdtB* 和 *cdtC* 编码。CDT 的毒素作用来自于 CdtB 亚单位的核酸酶活性,而 CdtA 和 CdtC 辅助 CdtB 进入宿主细胞。进入细胞核内的 CdtB 降解 DNA,通过特定的检控点激酶诱导细胞周期阻滞。研究显示:用伴放线菌聚集杆菌提纯的 CdtB 处理宿主细胞可导致细胞体积的显著膨胀、细胞 G1 期和 G2/M 周期阻滞、淋巴细胞凋亡,并可诱导多种细胞因子的表达。流行病学调查也显示:在慢性牙周炎患者龈下菌斑中伴放线菌聚集杆菌的检出率为 67%,其中 *cdt* 阳性的仅为 4%,而侵袭性牙周炎患者伴放线菌聚集杆菌携带率为 91%,33% 为 *cdt* 基因阳性。Fabris 等在 40 株伴放线菌聚集杆菌临床分离株中发现有 39 株都能引起 CHO 细胞的膨胀,40 株都能检测到至少一个 *cdt* 基因,34 株可检测到全部 *cdtABC* 基因。提示:伴放线菌聚集杆菌的 *cdt* 基因与侵袭性牙周炎相关。

第四节　牙周状态与牙周微生态的关系

牙周龈下菌斑中特异细菌的存在是牙周炎的主要微生物病因。牙周不同状态下,即牙周健康、牙龈炎、各型牙周炎时,牙周微生态组成均存在较大差异,虽然这种差异是牙周状态的结果或原因一直是牙周微生态研究的一个有趣、有待解决的议题。可以明确的是,牙周状况的改变总是伴随着牙周微生物群的改变。Kumar 等的研究还表明,在健康或者临床状态

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

稳定的患者中的微生物组成和数量也是最稳定的。

一、牙龈炎微生态特点

牙龈炎的发生发展是牙周微生物演替以及菌种与定植部位相互作用的一个很好的例子。Loe 等和 Theilade 等的实验性龈炎研究表明牙菌斑引起牙龈炎：牙周健康的志愿者停止刷牙 28 天造成牙面上菌斑快速堆积；在所有研究对象中 10～21 天发生牙龈炎；去除菌斑重新恢复口腔卫生，牙龈炎消失；28 天内染色涂片观察发现，最初定植的是革兰阳性球菌和杆菌，接着是革兰阴性球菌和杆菌，接着是梭杆菌和丝状菌，最后是螺旋菌（spirilla）和螺旋体；临床牙龈炎的出现与革兰阴性菌的出现相关。Danish 研究牙周部位细菌类型与该部位牙龈炎进展的关系，结果发现（图 12-5），在龈炎确立期的病损中，红色和橙色复合体的菌种比例较高，并且数量较多。在化脓性病损中以上组合具有更高的比例和数量。因此，菌斑中微生物组成显然影响定植部位（宿主），造成牙龈炎。反之，其他研究也显示，定植部位的改变，例如牙龈炎的进展也会影响菌斑本身。口腔清洁后，牙龈炎部位的菌斑堆积较牙周健康部位快得多。龈炎的微生物演替和宿主-细菌之间相互作用可见下模式图（各色复合体中细菌的组成将在后面章节阐述）：最初定植的是黄色、绿色、紫色和放线菌属，接着经过自主发展演替，橙色和红色复合体中细菌量占主要地位。橙红复合体细菌量增加造成宿主的改变，表现为牙龈炎。牙龈炎反过来不仅有助于橙红复合体细菌的增殖，还有助于早期定植菌的增殖。以上循环可能被许多方法打破，一是去除所有菌斑，这是目前普遍使用的策略；二是去除红色和（或）橙色复合体细菌，这样可能限制牙龈炎的进展，但是可能造成菌斑的进一步成熟；第三种方法可能是通过非抗菌的方式，减少菌斑的堆积并减少红橙复合体细菌，从而控制牙龈炎。

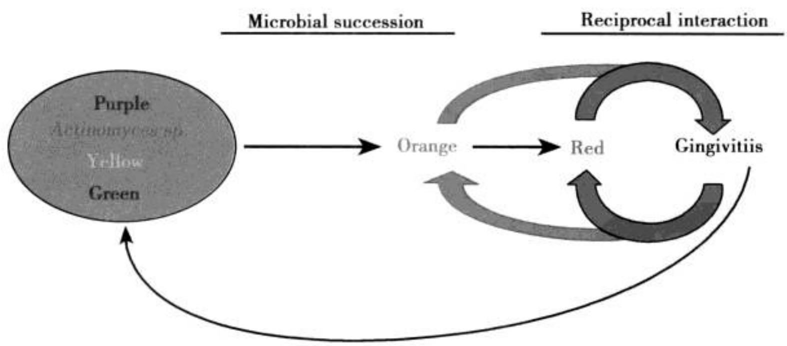


图 12-5 牙周微生物演替中细菌的增加与牙龈炎发生发展关系模式图

注：反之，牙龈炎症加重将导致定植细菌的增加。图片来自：Sigmund S Socransky, Annde D Haffajee. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, 2005, 38:135-187. P136, Fig. 1

Haffajee 等从 187 个全身及牙周健康者取得龈上菌斑样本，采用 DNA-DNA 杂交检测 40 种微生物的探针菌落数。结果发现，随着菌斑量的增加，菌斑内的菌种比例发生改变；牙龈炎症、龈袋深度等与其中菌落数存在正相关关系。无论牙龈是否存在炎症，菌斑数量的增加与龈袋深度相关。因此认为，龈上生物膜中菌种的比例受生物膜微生

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

物总数的影响。

二、牙周炎的牙周微生态特点

第一组成部分——牙周菌斑生物膜的组成特点

1. 牙周炎患者和牙周健康者龈下细菌的总量　牙周健康者和牙周病患者龈下生物膜中究竟有多少细菌呢？通过 Sharawy 等的研究数据可对此作一估计。Sharawy 等尽量仔细收集 14 名牙周健康者和 21 名牙周炎患者半口中的龈下菌斑，菌斑样本的平均干重分别是 1.6±0.8mg（牙周健康组）和 8.3±3.9mg（牙周炎组），换算成湿重为牙周健康组平均每半口具有 8.0mg 或每口 41.5mg 菌斑，牙周炎组每半口具有 16mg 或每口 83mg 菌斑。由于湿重每毫克龈下菌斑中显微镜下具有 2.1×10^8 个微生物，牙周健康者龈下菌斑中微生物总量大约为 33.6×10^8 个，牙周炎患者为 174.3×10^8 个。

2. 菌种的丰富性　龈下生物膜的微生物种类繁多，龈下大多数牙周致病微生物是革兰阴性（例外：*P. micros*、*S. intermedius*、*Eubacterium spp.*）和专性厌氧（例外：*A. actinomycetemcomitans*、*E. corrodens*）。Paster 等的研究显示，龈下生物膜中具有大约 500 种微生物，龈下菌斑样本中可检出包括 Obsidian pool、TM7、脱铁杆菌门（Deferribacteres）、螺旋体（Spirochaeta）、梭杆菌门（Fusobacteria）、放线菌门（Actinoba-cteria）、后壁菌门（Firmicutes）、梭菌属（"Clostridia"）、变形菌门（Proteobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）等十大门类的微生物。其中 1/2 以上为新发现的菌种。龈下菌种的丰富性可以用数量来表达：Socransky SS 和 Haffajee AD 研究显示，从 184 个牙周健康者和 592 个慢性牙周炎患者取得 20 247 个龈下菌斑样本，检测 40 种微生物的平均菌落数 $\times10^5$，其中，由于大部分取样部位都是浅袋，数量最多的菌种是 *A. naeslundii* 基因种 2，其他占优势的菌种包括变黑普雷沃菌、*P. intermedia*、*V. parvula*、*T. forsythia* 和产黑色素普雷沃菌。

以上 500 种微生物不是均一地分布在龈下区域。在任何一个检出部位，一些种类检出频率和数量远远高于另一些种类的微生物。生态学家常用多样性指数（diversity indices）来描述不同生态系中菌种的丰富性和均匀性。牙周健康组平均每个部位检出菌种数为 22 种，牙周炎组为 24 种（$P<0.05$）；两组间"丰富菌种"数之间没有差别；牙周健康组的"特别丰富菌种"数较牙周炎组多；牙周健康部位样本中菌种分布较牙周炎部位均匀。

3. 牙周健康和牙周炎的菌斑生物膜的组成差异　菌斑生物膜由 3 个部分组成：定植表面、定植微生物和大量的液体。龈上和龈下的以上组分是不同的，这就造成从龈上和龈下获得的生物膜的微生物组成不同。分别比较龈上和龈下生物膜中的各菌种平均菌落数和检出比例，牙周健康组中，龈上生物膜中的大多数菌种的平均菌落计数高于龈下生物膜。生物膜中放线菌的菌落数远远高于紫色、黄色、绿色和其他颜色的复合体。牙周健康的龈上和龈下菌斑中，菌种的比例没有明显的不同，只是在龈上部位放线菌和 *S. sanguis* 比例略高，而龈下部位橙色复合体的细菌比例略高。

牙周炎患者龈上和龈下菌斑的平均菌落数高于牙周健康者（图 12-6）。牙周炎龈下菌斑中许多菌种的菌落数高于健康者，特别是橙色和红色复合体中的细菌。牙周炎龈上菌斑中许多菌种的菌落数也高于健康者。与牙周健康者相比，牙周炎患者龈上和龈下生物膜中菌种的比例的差别也有显著性。牙周炎患者龈上生物膜中放线菌、绿色复合体中菌种增加，龈下生物膜中橙色复合体中的成员和红色复合体中的所有菌种的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

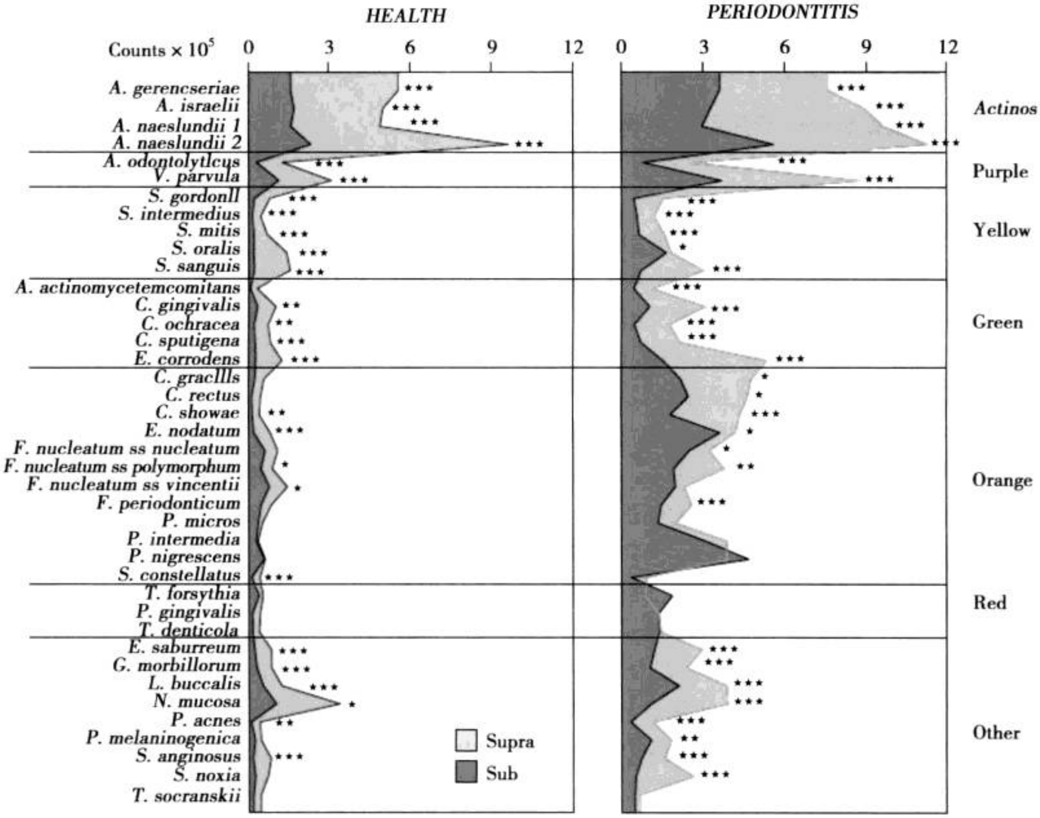


图 12-6　50 名牙周健康者(左)和 89 名慢性牙周炎者(右)龈上和龈下菌斑样本中 40 种菌种平均菌落计数

注:龈上菌斑和龈下菌斑均从每牙的近中面取样,采用 DNA-DNA 杂交法检测细菌。采用 Wilcoxon 符号秩检验法比较龈上和龈下菌斑中各菌种菌落数的差异。图片来自:Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, 2005, 38:135-187. P161, Fig. 20

比例显著增高。

特别是在牙周健康者中,龈上生物膜中许多菌种的菌落计数较在龈下生物膜中高,主要反映了龈上有较大的可供定植的空间,牙周健康者的龈沟不能对于大量微生物的定植提供足够的空间。牙周炎患者牙周袋为微生物的定植提供了较大的空间,对于大多数菌种来说,龈上区域的菌落数仍然较相邻的龈下部位稍高。就个体而言,牙周炎组的一些患者龈上样本的菌落数高于龈下样本,另一些则龈下样本的菌落数高于龈上样本。这也可能反映了个体的口腔清洁状况。

在牙周炎患者中明显显示出龈上与龈下微生态系中微生物组成的不同受多种因素的影响。龈上生物膜仅有一个定植面,即牙面;龈下则有两个面:牙面和龈沟或牙周袋上皮。此外,龈沟和牙周袋中还第三个“区域(地带)”的建立,即“疏松附着”的菌斑地带,其中具有较少的细胞内基质,该地带介于牙周深袋中牙面附着生物膜与上皮附着的生物膜之间,这里的微生物与牙面生物膜和上皮表面生物膜之间的附着程度(疏松或紧密程度)尚不清楚。但是,这个地带的存在是由于其中微生物被包围在四周狭窄的组织中,没有这样的包围,疏松

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

附着的菌种将被冲洗掉。龈上和龈下定植区域另一个主要的区别在于两者沐浴在不同的液体中，龈上生物膜与唾液接触，而龈下生物膜与龈沟液接触。龈沟液的成分不同于唾液，牙周健康者和牙周患者之间龈沟液的组分也不同。这些不同的组分可能对定植的菌种产生明显的影响，例如，来自牙周病部位的龈沟液就有利于螺旋体的生长。

Socransky SS 和 Haffajee AD 对 184 个牙周健康者和 592 个慢性牙周炎的龈下菌斑样本中获得的微生物档案显示（图 12-7）：牙周炎的龈下菌落数高于牙周健康者，牙周炎和健康者之间主要区别在于红色和橙色复合体。牙周炎患者中红色复合体的所有细菌（3 种）和橙色复合体中 12 种细菌中的 11 种都较健康者显著增高。*P. gingivalis*、*T. forsythia* 和 *T. denticola* 在牙周炎患者部位的检出频率、比例和数量都高于牙周健康者。此外，不能培养的菌种也在牙周炎较健康者的检出频率高。

健康者和牙周炎患者龈下微生物群的不同组成是遵循微生态规律的。既然牙周炎是由牙周定植的细菌引发的，那么，疾病的发生是由于龈下部位一种或多种细菌的一些改变造成的，还是由于定植部位（宿主）的一些改变造成的，目前还不明了。在牙周炎早期，定植的某

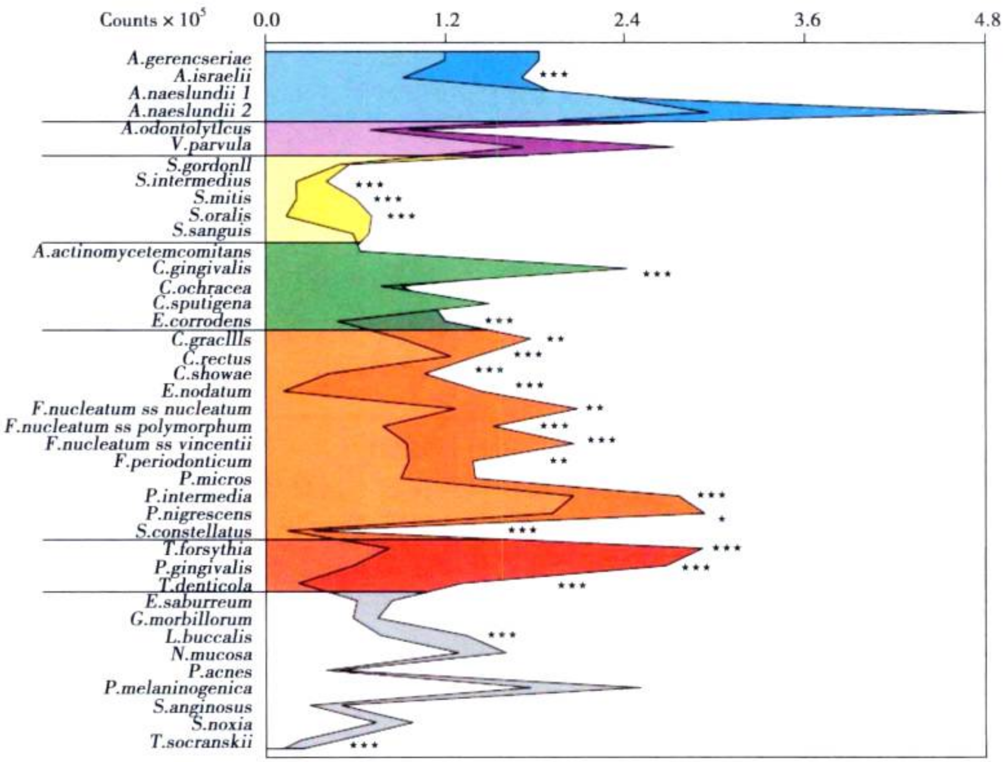


图 12-7 184 名牙周健康者和 592 名慢性牙周炎者基线时龈下菌斑样本中 40 种菌种平均菌落计数（$\times 10^5$）

注：菌种按照红、橙、绿、黄、紫和蓝色等复合体顺序排列，每种颜色的深色阴影部分代表牙周炎组，浅色部分代表牙周健康组。采用 Mann-Whitney 秩和检验比较组间每种细菌菌落数的差异：* $P<0.05$；** $P<0.01$；*** $P<0.001$。图片来自：Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, 2005, 38: 135-187. P169, Fig. 28

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

些细菌造成宿主的一些改变可能是局部炎症或牙周组织的丧失。另一方面，宿主组织的改变又会影响定植微生物群的组成和代谢活动。宿主和微生物群的这样来回往复最后会达成新的平衡，一个新的"顶级群落"(climax community)，这将导致在较长的时间内一个不稳定的宿主与微生物群之间的平衡。在牙周炎患者中取到的样本就正是这个"顶级群落"，这不是一夜之间形成的新的微生物组成，而是宿主和微生物之间可能经过许多年和无数次的来回往复，从最初牙周健康部位的顶级群落发展而来。

4. 牙周状态对牙周微生态的影响　影响龈下菌群组成的最重要因素是邻近牙周组织的临床状况，其中，两个因素最为重要：一是牙周袋炎症状况；二是牙周袋或龈沟的深度。通常，牙周疾病状态影响一部分菌种，尤其是红色和橙色复合体中的成员。592 名慢性牙周炎患者，根据全口牙周袋平均深度的四分位数(quartile，即统计学中，把所有数值由小到大排列并分成四等份，处于 3 个分割点位置的得分就是四分位数)分组，随着牙周炎严重程度的增加，微生物的轮廓图也有很大的变化，即随着平均牙周袋深度的增加，红色复合体的菌种的变化特别明显，其次是一些橙色复合体的菌种。

牙周袋深度与特异菌种菌落计数的关系的研究结果显示，袋深与大多数微生物没有关系。随着牙周袋的加深，橙色复合体中的多数菌种以及红色复合体中的所有细菌的数量增加。可能原因是：越深的袋提供越大的上皮表面，供红色复合体中的细菌(如*P. gingivalis*和*T. denticola*)附着；具有较大比例的橙色复合体细菌的疏松附着区存在于较深的牙周袋中；局部因素可能限制牙面细菌的生长，而促进疏松附着菌或上皮相关细菌的生长。是否能获得可发酵的碳水化合物可能限制牙面生物膜中解糖细菌的生长，而相对丰富的非糖能源如氢、甲酸盐、酸的终产物以及蛋白降解产物等，可能供养在橙色和红色复合体中的不解糖细菌的更好生长。

牙龈炎症也明显影响该部位的微生物组成。探诊出血的部位红色和橙色复合体中的成员显著增加，这些细菌增加的原因可能是因为它们距富含组织降解的产物的龈沟液近，可能有利于这些需要蛋白质或肽的细菌的生长(如 *P. gingivalis* 和*T. denticola*)，或者是其他能利用代谢终产物的细菌的生长(如弯曲菌)。

比较所有牙周炎患者牙周炎部位龈下菌群，即比较牙周袋深度≥6mm 且有探诊出血的部位以及健康部位，即牙周袋深度≤4mm 且探诊不出血部位的菌群组成。结果，两者的显著差别在于许多菌种龈下平均菌落数，特别是红色和橙色复合体中的细菌。牙周健康者牙周健康部位与慢性牙周炎患者牙周健康部位之间几乎所有受检菌种都有明显的差别，其中，差异特别明显的是橙色和红色复合体菌种。这些数据与 Riviere 等的发现一致：牙周炎患者健康部位中螺旋体和 *P. gingivalis* 的检出频率较牙周健康者健康部位高。

从临床角度看，这些数据提示牙周炎的健康部位可能比牙周健康者的健康部位更具有未来发生牙周破坏的危险。从生态学的观点看，这两个"健康"部位的不同很难解释。前面讨论中我们认为局部因素非常重要，例如牙周袋的深度、探诊出血等在两组间基本相同。那么问题是，为什么尽管局部定植条件相同，牙周炎患者和牙周健康者之间的微生物区还会有如此的不同呢？一个可能的推测是在较深的牙周袋储库中的大量的微生物可能不断地将细菌播散到邻近部位，使这些部位有少量定植。另一个可能性就是在牙周炎患者的一些部位，在疾病发生前，许多牙周浅袋部位就已经定植了某些微生物。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

也有宿主的因素影响龈下菌斑的组成，包括遗传因素、肥胖、习惯（例如吸烟）等都会影响龈下菌斑的组成。研究发现，血清中对 *P. gingivalis* 抗体水平与 *P. gingivalis* 在龈下菌斑中的水平呈相反关系，抗体水平越高，龈下菌群中 *P. gingivalis* 水平越低。

三、舌苔微生态与口臭

舌苔由脱落舌上皮、唾液、微生物和食物残渣组成。舌背乳头结构为许多微生物提供了适宜的定植环境和有益于专性厌氧菌生长的厌氧环境。在舌背上发现放线菌、链球菌、韦荣菌、梭杆菌和普雷沃菌等各种细菌，因此舌背可能是口腔细菌的储库和发源地。

口臭在成年人中较普遍。大约 90% 的口臭来自于口腔细菌代谢硫氨基酸产生的挥发性硫化物（volatile sulfur compounds，VSC）。VSC 的主要成分是硫化氢、甲硫醇、二甲基硫醚。口气重的人常常在舌背后方有大量的细菌。牙周病相关细菌中卟啉单胞菌和普雷沃菌产生 VSC，是牙周病患者口臭的原因；而常驻菌放线菌和韦荣菌产生硫化氢，是牙周健康口臭的原因。

硫化氢的产生主要来自 L-半胱氨酸脱巯基酶分解 L-半胱氨酸（cysteine），甲硫醇来自蛋氨酸酶分解 L-蛋氨酸。水解蛋白的细菌能分解蛋白质以提供以上代谢产物，但是在舌背苔中还没有发现有大量水解蛋白的细菌。在牙周袋和组织细胞中可见梭杆菌和消化链球菌能分解谷胱甘肽产生过氧化氢。过氧化氢和甲硫醇不仅能产生恶臭，而且对宿主组织有毒性。总的来说 VSC 的代谢和舌苔微生态系中口腔细菌对其的调节作用还有待进一步研究。

第五节　全身状况与牙周微生态的关系

一、吸烟对牙周微生态的影响

吸烟不仅是心脑血管疾病、癌症、慢性阻塞性肺病等多种疾患的行为危险因素，还是牙周病的重要全身促进因素之一。两项大规模的流行病学调查结果显示：美国牙周病患者中吸烟者和有既往吸烟史者约占总体人群的 42% 和 11%；澳大利亚罹患中度牙周炎和重度牙周炎的患者中，吸烟者的比例分别为 32% 和 56%。吸烟不仅增加了牙周炎的患病风险，还可显著影响牙周基础治疗、手术治疗及牙周维护期治疗的疗效。卫生部发布的《中国“吸烟与健康”报告》显示：“我国吸烟者约为 3.5 亿，占世界烟民的 1/3”。由此可见，吸烟对我国人民牙周健康状况的影响不容忽视。

烟草烟雾中的毒性物质可增加吸烟者甚至二手烟长期暴露者发生细菌感染的风险。Bagaitkar 等在 2008 年的一篇回顾性综述中指出：吸烟增加了包括牙周炎、肺炎、支气管炎、肺结核、囊性纤维化、细菌性脑膜炎、细菌性阴道炎、幽门螺杆菌感染、中耳炎等感染性疾病的患病风险；烟草引发的宿主生理状况和结构功能的改变、先天性和获得性免疫功能的失调以及烟草诱导的致病菌毒性变化可能是感染风险增加的三个重要原因。牙周微生态环境中菌斑微生物、原驻细胞、免疫细胞间相互作用的生理动态平衡同样受到烟草毒性产物的影响。一系列研究显示，尼古丁、可替丁等通过：①抑制牙周组织微血管生成、降低血管通透性；②抑制牙龈上皮细胞和成纤维细胞增殖和迁移能力、促进原驻细胞凋亡；③降低中性粒

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

细胞和单核-巨噬细胞吞噬及清除细菌能力、影响树突状细胞抗原呈递和加工、淋巴细胞功能和抗体产生等途径，降低了牙周组织对菌斑微生物的免疫防御反应，进而可能造成吸烟者与非吸烟者牙周微生境中菌斑微生物群的种类、数量及感染位点数的一定差别。Zambon 等调查了 798 名纽约市民，发现吸烟者 *T. forsythia* 的携带率为非吸烟者的 2.3 倍，*A. actinomycetemcomitans* 携带率为 3 倍。Umeda 等的研究显示：吸烟者龈下微生态环境中定植 *T. denticola*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. gingivalis*、*P. intermedia*、*F. nucleatum* 和啮蚀艾肯菌（*Eikenella corrodens*）的几率增加，危险度分析的结果为：吸烟与 *T. denticola* 定植的 OR 值为 4.61。Kamma 等发现：吸烟者的龈下菌斑中 *T. forsythia*、微小单胞菌（*Parvimonas micra*）、直肠弯曲菌（*Campylobacer rectus*）、简明弯曲菌（*Campylobacter concisus*）、纤细弯曲菌（*Campylobacter gracilis*）、生痰月形单胞菌（*Selenomonas sputigena*）检出率增加，而非吸烟者中内氏放线菌（*Actinomyces naeslundii*）、衣氏放线菌（*Actinomyces israelii*）、中间链球菌（*Peptostreptococcus intermedius*）、迟缓真杆菌（*Eubacterium lentum*）检出率增加。此外，Eggert 等的研究也证实：吸烟者龈下菌斑中 *T. forsythia*、*C. rectus*、*P. gingivalis* 和微小消化链球菌（*Peptostreptococcus micros*）的检出率和数量增加。

Miyamoto 和 Marsh 的研究团队对吸烟者龈下 *C. rectus* 检出率增加的原因分析从一个侧面揭示了吸烟导致牙周菌斑微生态改变的可能原因。他们认为 *C. rectus* 检出率的增加与 *P. gingivalis*、*T. denticola*、*T. forsythia*、*P. intermedia* 等数量增多密切相关。烟草燃烧产物（如一氧化碳、尼古丁等）可造成牙龈组织的血氧含量降低、龈沟或牙周袋内氧分压下降，这种低氧环境有利于厌氧牙周可疑致病菌的生存；而 *C. rectus* 具有利用其他微生物代谢产物（例如 *P. gingivalis*、*P. intermedia* 所产生的 H_2）的特点。因此，龈下菌斑中菌种分布和数量的改变可能为 *C. rectus* 等细菌提供了更为有利的生存环境，从而进一步决定了菌斑结构和组成的走向。Haffajee 和 Socransky 应用棋盘 DNA-DNA 杂交技术全面分析了 272 名不同吸烟状况人群龈下菌斑中牙周微生物复合体的分布情况，结果如图 12-8 显示，与未吸烟者和既往吸烟者相比，红色和橙色复合体微生物在吸烟者中更易检出，且这一差别主要存在于 PD<4mm 的牙周袋中；吸烟者与非吸烟者龈下微生物群的最主要区别可能不是种类和数量的差异，而是携带牙周致病菌位点数量的多寡。

烟草毒性物质不仅影响了牙周微生态中菌斑微生物的组成和结构，越来越多的证据表明，烟草毒性物质还通过调控牙周致病菌的毒力作用来加重吸烟者牙周组织的破坏。Sayers 等应用鸡胚毒性模型（chick embryo toxicity model）发现：尼古丁和可替丁与牙周可疑致病菌（*P. gingivalis*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*）毒性产物之间可产生致死性协同作用。*P. gingivalis*-LPS 与烟草毒性物质苯并芘共同作用后，对鼠骨髓细胞模型中骨形成的阻断能力增加。经香烟提取物预处理 *P. gingivalis* 后，影响了细菌诱导的宿主细胞前炎症细胞因子 IL-6、TNF-α 和抗炎细胞因子 IL-10 的分泌水平。David A Scott 课题组近期的系列研究还发现：香烟提取物可改变 *P. gingivalis* 功能基因谱的表达，包括 58 条基因的上调和 46 条基因的下调。这些表达变化的基因的编码产物很多与细菌宿主间的相互调控作用相关。例如：PG2133 和 PG2134 编码 *P. gingivalis* 主要菌毛 FimA 装配中必需的脂蛋白；PG0283 编码与细菌Ⅰ型分泌系统蛋白 HlyD 相关的流出转座子；PG1233、PG1234 和 PG0722 编码与 *P. gingivalis* 外膜囊泡形成有关的假定脂蛋白；PG2008 编码与 *P. gingivalis* 摄取亚铁血红素有关的 Ton-B 依赖型受体等。其中 PG2133 和 PG2134 的表达变化与 *P. gingivalis* 主要菌毛

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

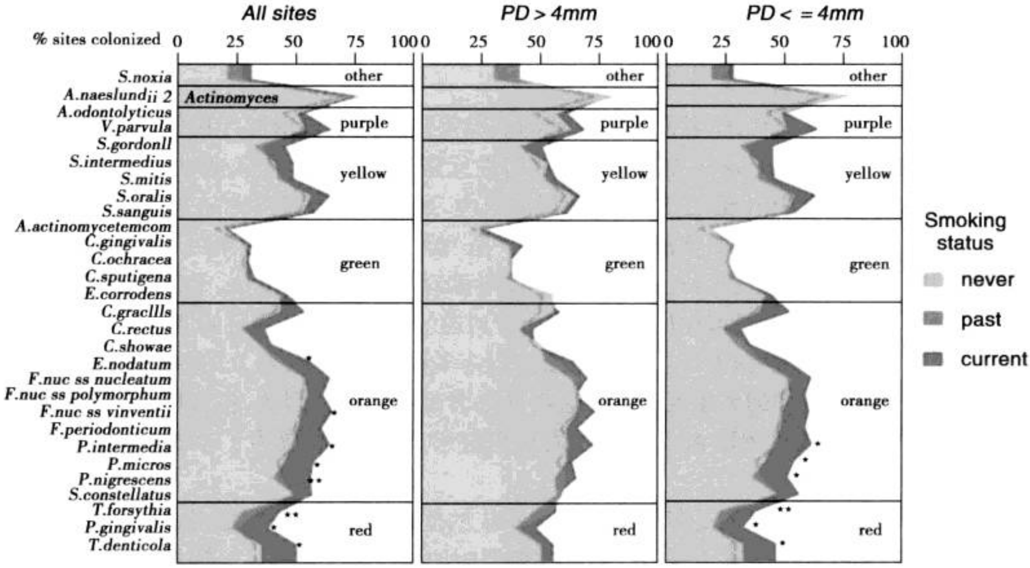


图 12-8　124 位未吸烟者、98 位既往吸烟者及 50 位吸烟者的龈下菌斑样本中 29 种微生物类群的平均定植情况(位点检出百分率)

注:通过方差分析显示:调整了不同探诊深度和附着水平的影响后,三组受试者微生物位点检出百分率具有显著性差异:* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$。图片来自:Sigmund S Socransky, Annde D. Haffajee. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, 2005, 38:135-187. P175, Fig. 34

FimA 所涉及的一系列毒性作用密切相关。研究显示,PG2133 和 PG2134 的敲除可导致细菌主要菌毛的长度明显变短、侵入巨噬细胞和胞内定植的能力显著下降,对大鼠动物模型诱导牙周炎的能力也有所减弱。Scott 等的研究显示,香烟提取物上调 PG2133 和 PG2134 的表达后,促进了 *P. gingivalis* FimA 蛋白的分泌,并由此通过增加 FimA 与戈氏链球菌(*Streptococcs gordonii*)表面蛋白 rGAPDH(FimA 的同源性配体)的结合,促进了牙菌斑生物膜的形成。FimA 除了在牙菌斑生物膜形成过程中发挥着与其他细菌接触黏附的重要作用外,还在细菌与宿主蛋白和细胞表面受体的结合中扮演重要角色。香烟提取物上调 PG2133 和 PG2134 的表达可从一个侧面揭示吸烟者更易携带 *P. gingivalis*、龈下位点 *P. gingivalis* 定植数量增加的原因。Scott 的研究还发现:香烟提取物通过下调外膜多糖编码基因 PG0111 和 PG0117,影响了 *P. gingivalis* 荚膜(capsule)的合成。*P. gingivalis* 的外膜多糖和荚膜可显著刺激鼠免疫细胞前炎症细胞因子的分泌,香烟提取物干扰 *P. gingivalis* 外膜的合成可能是导致细菌引起吸烟者牙周组织局部炎症反应降低的重要原因之一。尽管编码 *P. gingivalis* 外膜蛋白 RagA、RagB 的编码基因并未发生表达变化,经香烟提取物处理的 *P. gingivalis* 其 RagA 和 RagB 的蛋白表达水平上升。RagA 和 RagB 是 *P. gingivalis* 的两种重要毒力因子,分别为 TonB 类受体外膜蛋白和具有免疫显性的表面抗原脂蛋白,Rag 蛋白构成膜转运系统,协助细菌转运大分子入胞内,有助于细菌的存活和散播。香烟提取物还可在转录后水平调控 *P. gingivalis* 毒力因子的表达,促进 *P. gingivalis* 在牙周微生态环境中的定植。

从现有的研究可以得出以下结论吸烟对牙周微生态平衡的影响可能是其促进牙周病发

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

生发展的重要因素。其中的具体机制还有待于进一步的研究和探讨。

二、性激素对牙周微生态的影响

早在20世纪50年代，学者们就通过动物实验发现雌激素可引起牙周硬软组织的组织病理变化。1970年，Formicola等将标记了放射性元素的雌二醇注射入雌性大鼠的体内，证实激素不仅在生殖道中出现，还出现在牙龈组织内，牙龈组织细胞中存在特异的性激素受体，牙龈组织是部分性激素的靶器官。随后的一系列研究显示：①性激素可影响上皮细胞和成纤维细胞的增殖、分化及生长，进而削弱上皮屏障对侵入细菌的抵抗、干扰结缔组织中胶原的代谢平衡；②性激素可增加局部组织的血管通透性和血管内皮细胞的增殖，加剧免疫炎症细胞的局部渗透；③性激素可刺激宿主细胞表达多种细胞因子，调节局部免疫炎症反应；④分布在成骨细胞表面的雌激素受体可直接介导骨组织代谢。因此，各种可引起机体性激素水平变化的生理或病理因素是否对牙周组织健康产生影响，成为了学者们关注的问题之一。

性激素水平的变化可能是多种牙龈疾病发生的促进因素，青春期龈炎、妊娠期龈炎、妊娠性龈瘤等。引起女性激素水平波动的最主要原因即为月经周期。月经周期（menstrual circle）是指由性激素的分泌所调控的为期25～30天的生理变化过程，可分为增殖周期和分泌周期两个阶段。增殖周期表现为促卵泡激素（follicle-stimulating hormone，FSH）、黄体化激素（luteinizing hormone，LH）、雌二醇的逐渐增加。通常在月经周期的第14天左右，LH的水平会迅速而显著地升高，导致排卵。随后的分泌周期表现为LH和FSH下降、黄体酮水平升高。由于牙龈组织是女性激素的特异性靶器官之一，因此，青春期、妊娠期、绝经期以及口服避孕药等可干扰激素水平的内源或外源性因素都可能影响原有牙龈炎症的转归。其中，妊娠性龈炎是最具代表性的例子。

Berg等报道，妇女怀孕期间唾液中的雌二醇水平大约为100pg/ml，几乎是未怀孕女性的10倍以上。一项最新的流行病学调查则显示约40%～50%的孕妇都曾罹患妊娠性龈炎。妊娠期间原有牙龈慢性炎症的加重除可归因于上述研究结论外，性激素引起的牙周微生态改变也是一个可能的重要原因。妊娠期间女性激素水平变化对牙周微生态影响的研究始自1980年Kornman和Loesche对妊娠妇女龈下微生物组成变化的调查，结果发现，在妊娠第4～6个月时孕妇龈下 *P. intermedia* 的检出率增加，且与牙龈炎症加重有关。一项横断面研究显示：怀孕女性携带 *P. intermedia* 的几率是未怀孕女性的55倍。通过对妇女妊娠期间和产后两个时间点进行实验性龈炎的干预研究，比较了妊娠对龈下细菌组成的可能影响，发现：妊娠期间的实验性龈炎可使受试者 *P. intermedia* 的检出率从1.1%增加至10%，而这一现象未能在相同受试群体的产后试验中发现。类似的研究结果在其他可引起性激素水平波动的生理改变中也被发现，例如：产黑色素菌属、嗜二氧化碳菌属、螺旋体在青春期受试者中的检出率增加；口服避孕药使妇女龈下携带 *P. intermedia* 的风险增加约16倍等。由此推断，某些性激素水平的升高可能促进了与牙龈炎症相关的特殊牙周致病菌的过度生长。性激素可能是一些牙周可疑致病菌的生长因子。*P. gingivalis* 和 *P. intermedia* 可应用黄体酮和雌二醇来替代维生素K；雌激素可直接与延胡索酸还原酶系统相作用，妊娠期间 *Prevotella intermedia* 数量的增加导致 *P. intermedia* 利用雌激素产生的延胡索酸盐浓度增加，而延胡索酸盐能够刺激简明弯曲菌的生长，因此雌激素又间接促进了 *C. rectus* 的生长。Yokoyama等最近的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

研究也显示：妊娠期妇女唾液中雌二醇的浓度与 *P. gingivalis*、*F. nucleatum*、*C. rectus* 的水平存在相关性，OR 值分别为：0.457、0.452 和 0.434。

妊娠期间牙周微生态的具体变化在不同研究中得到的结论并不一致。Ana 等设计了一项队列研究来比较妊娠过程对女性龈下菌斑组成的影响，结果显示，龈下菌斑中的细菌总量在孕妇和非孕妇之间无显著差别，且妊娠期间及分娩后孕妇的细菌总量也无明显变化；怀孕期间最常被检出的细菌依次分别为：*F. nucleatum*（88.10～97.62%），*P. intermedia*（47.62%～66.67%），*Parvimonas micra*（42.86%～50%），*P. gingivalis*（35.71%～40.48%），*C. rectus*（11.9%～14.29%），*A. actinomycetemcomitans*（9.52%～21.43%）。牙周致病菌的检出率在妊娠和生产后的不同阶段会发生相应的变化。*A. actinomycetemcomitans* 和 *Parvimonas micra* 的检出率从妊娠早期开始增加，至第 4～6 个月达峰值，随后逐渐下降；*P. gingivalis* 在妊娠早期和晚期的检出率增加，而妊娠中期和产后减少；妊娠后期与产后比较，*A. actinomycetemcomitan*、*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*Parvimonas micra* 和 *F. nucleatum* 检出率明显下降，而 *P. intermedia* 和 *C. rectus* 则升高。有趣的是，在 Gursoy 等和 Muramatsu 等的研究中也发现了妇女生产后 *P. intermedia* 检出率升高这一现象。这与早期提出的妊娠期间 *P. intermedia* 水平升高而产后降低的结论存在一定偏颇。Gursoy 等发现，伴随着妊娠中期龈炎临床症状的加重，*P. intermedia* 属（*P. intermedia* sensu lato）在龈下菌斑中的平均数达到峰值，随后两者均逐渐下降；分娩后尽管龈炎症状持续缓解，*P. intermedia* 属在菌斑和唾液中的检出率呈现出短暂的升高；通过 PCR 检测显示这一变化的 *P. intermedia* 属由 *P. nigrescens*（95.3%）、Pi（2.5%）和无法确定的 *P. intermedia* 属细菌（2.2%）组成。Adriaens 等通过棋盘 DNA 杂交法系统检测了怀孕 12 周至分娩后 4～6 周孕妇龈下 37 种细菌的变化，结果显示：①妊娠阶段龈下细菌的总量明显升高，而产后下降；②比较自妊娠期到产后的 4 个观察时间点后，只有黏液奈瑟球菌表现为检出水平的持续上升，另外 17 种细菌呈现逐渐下降的趋势，包括：黄褐二氧化碳嗜纤维菌（*Capnocytophaga ochracea*）、生痰二氧化碳嗜纤维菌（*Capnocytophaga sputigena*）、砂真杆菌（*Eubacterium saburreum*）、*F. nucleatum*、口腔纤毛菌（*Leptotrichia baccalis*）、微小消化链球菌（*Parvimonas micra*）、*P. intermedia*、*Prevotella melaninogenica*、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、咽颊炎链球菌（*Streptococcus anginosus*）、中间消化链球菌（*Peptostreptococcus intermedius*）、*S. mutans*、*Streptococcus sanguinis*、牙周月形单胞菌（*Selenomonas infelix*）、小韦荣菌（*Veillonellen parvula*）；③生产后 6 周，*P. intermedia* 和 *Veillonellen parvula* 水平与孕 36 周相比轻微升高；④*A. actinomycetemcomitans*、*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*T. forsythia* 无明显变化。该结果又与 Ana 等的结果不甚相同。造成结果差异的可能原因与检出手段的差异有一定的关系，因此，性激素对牙周微生态的影响及其相关分子机制具有非常广阔的研究前景，值得深入分析。

三、糖尿病与牙周微生态

糖尿病（diabetes mellitus，DM）是由多种因素作用于机体导致胰岛素功能减退、胰岛素抵抗等而引发的一系列代谢紊乱综合征，主要分为胰岛素依赖型糖尿病（1 型糖尿病）和非胰岛素依赖型糖尿病（2 型糖尿病），其中 2 型糖尿病最为常见，约占患者的 90%～95%。根据世界卫生组织报道：2011 年全世界共有 3.46 亿人患有糖尿病，2030 年这一数字可能增长一倍以上，其中 80% 集中在发展中国家。我国是糖尿病的第二高发国，糖尿病已成为继肿

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

瘤、心血管疾病之后的第三大严重威胁国民健康的慢性疾病。因此,对糖尿病及其并发症的防治工作任务艰巨。

牙周炎已被列为糖尿病的第六大并发症。血糖控制不良的 DM 患者常表现为牙龈红肿、反复溢脓、息肉样牙龈增生、快速进展性牙槽骨吸收等症状。Cianciola 等于 1982 年的研究发现,持续高血糖状态与牙周病的发生发展存在相关性;牙周病患病率在 13 ~ 18 岁的 1 型 DM 患者中为 13.6%,19 ~ 32 岁者则大于 39%。对 2 型糖尿病高发人群北美印第安 Pima 人的调查显示:该人群 35 岁以上者约 50% 发生 2 型糖尿病,糖尿病使这一人群患有牙周炎的几率增加了 3 倍,部落内 DM 患者比非 DM 患者的失牙量高出 15 倍。多项不同种族背景人群的流行病学调查也都证实糖尿病患者发生牙周炎的相对危险度比值比范围为 2 ~ 4。

糖尿病导致的高血糖状态和机体免疫功能的改变是目前被广为接受的 DM 影响牙周健康的重要原因。高血糖状态可提高机体对微生物的敏感性。Naguib 等的研究显示:DM 大鼠和健康大鼠在接种 *P. gingivalis* 后的早期,两组局部多形核白细胞的浸润量和多形核白细胞趋化因子巨噬细胞炎症蛋白 2 的表达水平无显著差别;3 天后对照组检测指标水平下降,而 DM 组变化甚微。Liu 等应用灭活 *P. gingivalis* 致炎 DM 大鼠后也发现:高血糖状态可改变硬软组织对细菌的反应,DM 大鼠的接种局部出现更多的 caspase-3 阳性的凋亡细胞。高血糖状态还可降低牙周组织中成纤维细胞和成骨细胞合成胶原及基质的能力,间接干扰了组织损伤后的修复潜能。糖尿病可引起机体免疫炎症调节功能紊乱,从而造成牙周微生态状态的改变。糖化血红蛋白(HbA1c)是判断糖尿病患者血糖控制情况的重要指标,正常人的 HbA1c 值为 5%,DM 患者 HbA1c 控制在 7% 以下为良好状态。研究显示,HbA1c 值 >8% 的 DM 伴牙周炎患者的龈沟液中 IL-1β 水平为<8% 的 DM 伴牙周炎患者的 2 倍以上。晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGEs)是一种非酶类的葡萄糖与蛋白的结合体,是体内高血糖状态导致的蛋白质不可逆糖化反应的产物。近年来大量研究证实,组织中过度形成和堆积的 AGEs 是导致糖尿病并发症的最主要原因。AGEs 可与中性粒细胞和单核-巨噬细胞表面的糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products,RAGE)结合,使免疫吞噬细胞处于高敏感状态,对来源于牙周菌斑生物膜的革兰阴性菌 LPS 反应过度,激活炎症级联反应并导致大量的细胞因子和炎症介质(如 IL-1β、TNF-α、PGE_2、活性氧自由基等)产生。在 DM 动物模型中应用 RAGE 受体阻断剂能显著减少 AGE 在牙周组织中的堆积,降低局部 TNF-α、IL-6 和 MMP 水平,抑制 *P. gingivalis* 引起的牙槽骨丧失。

牙菌斑生物膜是牙周炎的始动因素。尽管很早就提出 DM 患者的高血糖状态可能造成牙周龈下菌群改变的推测,但截至目前,相关研究结果仍无定论。早期的研究显示:1 型糖尿病患者的龈下菌群主要由二氧化碳噬纤维菌属、厌氧弧菌属、放线菌属组成,而 *P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia* 等与牙周炎密切相关的致病菌的数量却较少。然而,随后的 Mashimo(1983)、Morinushi(1989)和 Mandell(1992)相继报道:1 型 DM 患者龈下 *A. actinomycetemcomitans* 检出率或血清中 *A. actinomycetemcomitans* 的 IgG 抗体高于对照组;二氧化碳噬纤维菌属很少,产黑色素拟杆菌、*P. intermedia*、*P. melaninogenica* 和 *Campylobacer rectus* 数量增加。另有研究认为,1 型 DM 患者和非 DM 患者的龈下菌群组成无显著差异。2 型糖尿病患者龈下微生物组成的研究同样众说纷纭。Zambon 等对 Pima 人 2 型 DM

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

伴牙周炎患者的分析显示:重度牙周病损位点最常检出的细菌为 *P. intermedia*,其次分别为 *Campylobacer rectus* 和 *P. gingivalis*。Thorstensson 等发现,*P. gingivalis* 在 2 型 DM 患者中的检出率增加,而 *A. actinomycetemcomitans*、二氧化碳噬纤维菌、*Eikenella corrodens*、弯曲菌、*Fusobacterium nucleatum* 和 *P. intermedia* 不变。潘亚萍等的研究认为:与单纯慢性牙周炎患者相比,2 型 DM 伴牙周炎龈下菌斑中 *P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans* 和 *T. forsythia* 的检出率升高,而 *P. intermedia* 降低。另有研究则显示,DM 患者的龈上菌斑中 *Prevotella melaninogenica*、*Treponema denticola*、*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus oralis*、*Peptostreptococcus intermedius* 的检出率发生了变化,唾液和龈下菌斑中的细菌组成与非 DM 者无差别。Field 等应用 Taqman 定量 PCR 技术比较单纯牙周炎和牙周炎伴 2 型 DM 患者的龈下菌斑也未发现两组人群 *P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*、*Fusobacterium nucleatum* 携带情况的差异。然而,两项最新的研究分别应用 DNA-DNA 棋盘杂交技术和 16S rRNA 基因克隆和测序技术再次分析了 DM 患者龈下微生物群的菌种分布情况,得出了一些更为全面的结论。Ebersole 等比较了 63 名西班牙裔美国人的龈下微生物群,几乎所有的 DM 患者牙周健康位点均可检出革兰阳性菌、链球菌属和放线菌属;20% ~40% 的 DM 患者牙周健康位点可检出梭杆菌属、有害新月形单胞菌、*P. intermedia* 和 *A. actinomycetemcomitans*;DM 患者的疾病位点 *P. gingivalis*、二氧化碳噬纤维菌属、*A. actinomycetemcomitans*、*T. forsythia*、变黑普氏菌、有害新月形单胞菌、*Treponema denticola* 明显升高;与非 DM 患者相比,DM 患者疾病位点的 *P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans* 和二氧化碳噬纤维菌属检出率升高。Casarin 等分析了来自 DM 和非 DM 的中重度牙周炎患者龈下样本中的 2012 个细菌克隆后发现:在非糖尿病的牙周炎患者中卟啉菌属、绒毛产线菌、真细菌、synergistetes、坦纳菌属和密螺旋体的检出率较高;DM 伴牙周炎患者中最常检出的菌属为 TM7、放线菌属、奈瑟菌属、孪生菌属、艾肯菌属、月形单胞菌属、放线杆菌属、二氧化碳噬纤维菌属、梭菌属、韦荣菌属、链球菌属。作者还进一步分析了二氧化碳噬纤维菌属检出率升高的原因可能为该菌属可发酵葡萄糖作为代谢底物和能量源,血糖升高影响了龈沟液葡萄糖的水平,因此有利于该菌属的生长。Casarin 等和 Nowakowska 等的研究也证实,血糖水平可控制 DM 个体龈下牙周袋中 1 型 Epstein-Barr 病毒和念珠菌的定植。部分学者认为,尽管 DM 患者和非 DM 患者的龈下牙周微生物群的细菌组成无明显异同,同种细菌的毒力在两组人群中可能存在差异。血糖控制不佳的 DM 患者龈下菌斑对 BANA 代谢底物的降解作用增强,BANA 为牙周致病菌精氨酸特异性蛋白酶的代谢底物,提示,DM 患者携带的牙周致病菌具有更强的蛋白酶水解活性。Makiura 等发现,经过牙周基础治疗后血糖水平仍控制不好的患者与血糖恢复正常者相比,携带 Pg 的比例更高;菌毛 Ⅱ fimA 型 Pg 仅在 HbA1c 持续高水平的人群中检出,HbA1c 降低者中未能检出 Ⅱ fimA 型的 Pg,且这一特点并未在其他菌毛基因型 Pg 中发现。Ⅱ fimA 型 Pg 是与慢性牙周炎发生发展最为密切的 Pg 亚型,具有更强的致病力。以上研究从另一个侧面提示:携带细菌毒力的差异可能是 DM 患者龈下菌群无显著变化,但牙周组织破坏加重的另一方面原因。

四、心血管疾病与牙周微生态

心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)是一种严重威胁人类健康的疾病。尽管许多危险因素,如高胆固醇血症、脂代谢异常、高血压、糖尿病、吸烟、肥胖、阳性家族史等已被明确,但这些传统危险因素只能解释 50% ~75% 的 CVD 发病情况的差异,仍有约 20% ~50%

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的 CVD 事件难以用传统危险因素解释其发病的原因。冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病,coronary heart disease,CHD)是最常见的心血管疾病之一,其发生与冠状动脉粥样硬化狭窄的程度和支数密切相关。近年的研究认为,CHD 的基本病变——动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)具有慢性炎症病损的特征,为炎症性疾病。慢性感染及其引发的炎症反应可能是 AS 的危险因素。牙周炎是由致病微生物感染引起的炎症性疾病,导致机体多种细胞因子和炎症介质的水平升高。研究显示,一个广泛性中重度牙周炎患者的龈下微生境中,与菌斑生物膜接触的牙周袋内壁溃疡面积之和接近成年人手掌面积大小。这一连续性遭到破坏的上皮界面可使原本定植在口腔中的微生物进入全身血液循环,成为一些远端器官感染的原因。此外,牙周炎与 CVD 还具有许多共同特点,均好发于中老年男性,同样受遗传、环境等多种危险因素的影响,且发病机制具有明显的相似性。因此,牙周炎与 CVD 的相关性研究受到众多学者的关注。

1989 年,Mattila KJ 等和 Syrjanen J 等的研究团队几乎同时报道了口腔健康状况和急性心肌梗死之间的显著相关性,排除年龄、总胆固醇、高密度脂蛋白、甘油三酯、C 反应蛋白、高血压、糖尿病和吸烟等传统危险因素后,口腔感染者发生心肌梗死的几率高于无口腔感染者近 30%,其中牙槽骨吸收和附着丧失程度与心肌梗死的发生显著相关。随后的多项流行病学调查和系统性评价分析都发现:中、重度牙周炎与 CVD(尤其是 CHD)高度相关。最近来自韩国和芬兰的病例对照研究再次证实了这一结论。两国非吸烟人群中牙周感染与非致死性脑卒中之间的 OR 值分别为 3.3(95% CI:1.7 ~6.7)和 3.31(95% CI:1.31 ~8.40)。另一项分析了美国 22 个州 41 891 名受试者的行为危险因素调查结果显示:非吸烟人群中 CHD 与缺失 1 ~5 颗牙的 OR 为 1.39(95% CI:1.05 ~ 1.85),与缺失 6 ~31 颗牙的 OR 为 1.76(95% CI:1.26 ~2.45)。吴亚菲等也发现,我国人群中 CHD 患者的牙周状态较无 CHD 者差,中、重度牙周炎患者发生 CHD 的危险度较牙周健康者升高(OR=2.527,95% CI:1.011 ~6.319),“牙周感染可能是 CVD 的独立危险因素”这一观点目前已被广泛接受。

牙周微生物及其代谢产物进入血液循环被认为是连接牙周感染和 CVD 的重要启动因素。Geerts 等发现,轻度的咀嚼就可能引起牙周病患者的一过性内毒素菌血症,并且这一危险会随着牙周感染的严重程度增加。刷牙和牙科治疗也可能引起菌血症,研究显示,龈下刮治后牙周炎患者的菌血症程度明显重于牙龈炎和牙周健康者。牙周感染造成的局部微生态改变势必与 CVD 的发生发展存在相关性。美国口腔感染和心血管流行病学调查组(oral infections and vascular disease epidemiology study,INVEST)收集了来自于 657 位受试者的 5000 份龈下菌斑样本,定量分析 11 种龈下微生物与 CVD 的关系,结果发现当矫正了传统危险因素后,高水平的 *P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*、*T. forsythia*、*Treponema denticola* 与动脉血管内膜增厚程度呈正相关性。Andriankaja 等 2011 年的调查也证实牙周袋内牙周致病菌数量的增加可增加心肌梗死的风险,携带 3 种以上致病菌的人群发生心肌梗死的风险是没有携带任何致病菌人群的 2 倍(OR=2.01,95% CI:1.31 ~3.08),其中 *T. forsythia* 与心肌梗死的 OR 为 1.62(95% CI:1.18 ~2.22),Pi 的 OR 为 1.40(95% CI:1.02 ~1.92)。Mustapha 应用 meta 分析综合评估了研究牙周致病菌血清抗体滴度水平与 CHD 相关性的文献后得出结论:36% 的 CVD 事件与牙周致病菌血清抗体滴度水平升高具有相关性;仅纳入 CHD 时,两者之间的 OR 值为 1.75(95% CI:1.32 ~2.34)。多项研究应用 PCR、厌氧培养、DNA-DNA 棋盘杂交及荧光 FISH 标记等技术还发现入血的牙周致病菌可定植在动脉粥样硬化斑块中。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

Figuero 等(2012)研究结果显示 42 个受检的 AS 斑块中均发现至少一种牙周致病菌,其中最常见的为 *P. gingivalis*(78.57%),其次分别为 *A. actinomycetemcomitans*(66.67%)、*T. forsythia*(61.90%)、*Eikenella corrodens*(54.76%)、*Fusobacterium nucleatum*(50%)、*Campylobacer rectus*(9.52%)。另有研究还发现在其检测的 AS 斑块中约 74% 存在 *S. mutans* 的 DNA。提示牙周炎引起的袋内壁上皮连续性破坏除了使牙周致病菌进入血液循环后,还为其他口腔内定植微生物提供了契机。

目前,有关牙周感染与 CHD 相关的可能分子机制的研究主要包括以下几个方面:①牙周致病微生物黏附和侵入血管内皮细胞后引起的细胞功能紊乱;②牙周致病微生物引起的单核-巨噬细胞的细胞功能变化;③牙周致病微生物促进血小板的聚集和血栓的形成;④牙周致病微生物引起的自身免疫反应在粥样硬化斑块形成中的作用;⑤牙周感染引起的炎症介质改变对动脉粥样硬化发生发展的影响。

动脉粥样硬化斑块形成的起始为内皮膜和内皮细胞层的损伤。牙周致病菌进入血液循环后,黏附和侵入血管内皮细胞不仅可帮助自身躲避宿主的免疫防御攻击,还是干扰内皮细胞功能、引发血管壁损伤的条件之一。吴亚菲等通过体外实验比较了 *P. gingivalis*、*P. intermedia*、*A. actinomycetemcomitans* 和 *Fusobacterium nucleatum* 对脐静脉内皮细胞的黏附和侵入能力,发现 4 种牙周常见致病菌均可以黏附和侵入血管内皮细胞,其中 *P. gingivalis* 的侵入能力最强;*P. gingivalis* 侵入血管内皮细胞后可通过上调 TLR2 受体而激活相应的信号通路,进而使得 NF-κB 形成核移位和基因转录,相关黏附分子(如 ICAM-1、E-selectin 和 P-selectin)表达上调,引起内皮细胞黏附功能紊乱。与 *P. gingivalis* 共孵育后的内皮细胞对单核细胞的黏附能力明显增加。牙周致病菌不仅通过直接与内皮细胞接触来干扰细胞正常的生理功能,还释放特异性细菌代谢产物,如蛋白酶、脂多糖 LPS、外面囊泡 OMVs 等,刺激内皮细胞表达各种前炎症细胞因子和趋化因子,促进细胞间连接蛋白降解,诱导细胞凋亡。Fitzpatrick 等发现:*P. gingivalis* 活菌以及 LPS 可通过刺激内皮细胞膜表面的 Weibel-Palade 小体释放血管生成素 2 等生物活性分子,促进内皮细胞分泌 IL-8。Yomuto 等报道齿蚀艾肯菌可通过丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号通路促进内皮细胞血管的前炎症反应。

血液中的单核细胞黏附聚集于血管内皮细胞表面后,迁入动脉内膜下吞噬脂质转化为泡沫细胞,是 AS 发病的早期病理表现。牙周致病微生物及其 LPS 不仅能够干扰血管内皮细胞的黏附功能,还通过促进单核细胞表面的趋化因子受体 CC 类趋化因子受体-2 的表达以及促进中性粒细胞、内皮细胞分泌 IL-8、MCP-1 和 MIP-2 等趋化因子,来影响单核细胞向血管壁表面的聚集。此外,*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*-LPS 被证实具有促进单核细胞吞噬低密度脂蛋白和形成泡沫细胞的能力。Lakio 等通过研究发现 LPS 的刺激能降低单核-巨噬细胞的清道夫受体 B 和 ATP 结合体转运子-1 的 mRNA 表达,而这两种受体都介导了巨噬细胞外排胆固醇的能力。

动脉粥样硬化斑块的成熟涉及血小板的激活及向受损内皮膜局部的黏附和聚集。目前认为血小板是唯一的既作用于动脉粥样硬化的炎症反应,又作用于血栓形成的细胞。近年来,很多研究报道牙周致病菌(特别是 *P. gingivalis*)能促进血小板的凝集。蛋白酶激活受体家族(protease-activated receptors,PARs)是一组广泛存在于全身各种组织细胞中、具有 7 个跨膜单位的 G 蛋白偶联受体。其可被多种内源性及外源性蛋白酶激活,参与炎症和免疫反应。人血小板表达 PAR-1、PAR-3 和 PAR-4,其中 PAR-1 表达较高。PAR-1 与血小板的活化

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

和聚集有关,其激活能单独完成血小板聚集和分泌,PAR-3 辅助激活 PAR-4,较 PAR-1 迟发信号,介导晚期血小板的聚集,对血凝块稳定起生理学作用。Lourbakos 等发现低浓度的 *P. gingivalis* RgpB 和 HRgpA 即可刺激血小板表面 PAR-1 和 PAR-4 的活化,上调血小板中钙离子浓度水平,产生类凝血酶样作用,介导炎症反应,引起血小板的聚集,参与血栓的形成。PARs 还可调控血管内皮细胞的生理功能。Inomata 等发现 *P. gingivalis* RgpA 可通过激活血管内皮细胞的 PARs,诱导细胞中 Weibel-Palade 小体脱颗粒,引起血小板与内皮细胞的黏附、参与血栓形成。

自身免疫是机体免疫系统对自身组织成分产生免疫应答的能力。研究显示:牙周致病菌的表面结构蛋白与多种宿主细胞蛋白具有高度的同源性,从而引发免疫系统对自身组织成分的攻击。热休克蛋白(heat shock protein,HSP)是一类进化上高度保守的蛋白家族,同族的 HSP 在不同物种中均有很高的同源序列。人类 HSP-60、90 分别与微生物的生长调节致癌基因(growth control carcinogene,Gro)EL 和 HtpG 具有同源性。牙周炎患者血清中的 HSP-60 和 *P. gingivalis* GroEL 分别与对应的抗体存在着交叉反应;*P. gingivalis* GroEL 不仅存在着对人 HSP-60 的分子模拟,还可表达 HSP-90 样(HtpG-like)蛋白。*Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 可表达 HSP-60 样和 HSP7-0 样(DnaK-like)蛋白。*A. actinomycetemcomitans* GroEL 的单克隆抗体可与纤连蛋白存在交叉反应。这种牙周微生物和宿主细胞蛋白之间的交叉免疫反应常导致血管内皮细胞的损伤。牙周致病菌不仅能够模拟宿主蛋白抗原,还具有促进细胞自身免疫性抗体的形成。抗中性粒细胞抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies,ANCA)是一种针对中性粒细胞和单核细胞细胞质成分的自身抗体。当中性粒细胞受抗原刺激后,细胞质中的嗜天青颗粒释放蛋白酶-3(PR-3)、髓过氧化物酶和白细胞抗原,刺激机体产生 ANCA,ANCA 的出现可能导致中性粒细胞功能障碍。研究显示具有超抗原活性的牙周致病菌细菌蛋白可选择性地刺激表达 T 细胞受体 β 链变异基因片段的 T 细胞,引起 B 细胞分化并产生 ANCA;而 *A. actinomycetemcomitans* 和 *Prevotella intermedia* 则具备这种刺激宿主表达特异性 T 细胞的作用。抗心磷脂抗体(anticardiolipin,ACA)是一种以血小板和内皮细胞膜上带负电荷的心磷脂作为靶抗原的自身抗体,它与血栓形成密切相关。牙周致病菌能通过分子模拟宿主血浆蛋白刺激 ACA 的产生,从而促进内皮细胞和血小板的黏附,加速 AS 斑块的形成。因此,牙周微生物引起的自身免疫反应可能也是牙周炎与心血管疾病间重要的关联因素。

升高的系统性炎症水平是心血管疾病发生的预测指标。长期的牙周感染不仅是机体各种细胞因子和炎症介质表达的重要刺激源,还可能通过其产生的炎症介质刺激肝脏合成急性期蛋白而引发全身的急性期反应和炎症反应,影响 CHD 的发生、发展。吴亚菲等的流行病学调查显示:校正了吸烟、系统性疾病、体重、年龄和性别的混杂作用后,中、重度牙周炎患者血浆中的急性期蛋白如纤维蛋白原(Fg)和 C-反应蛋白水平显著高于牙周健康者;升高的 Fg 可促进 PMN 分泌 IL-1β 和 IL-8;C 反应蛋白可刺激内皮细胞增殖、凋亡和表达 MCP-1,并促进单核细胞表达 CCR2 受体及增加细胞趋化能力的作用。*P. gingivalis* 和 *P. intermedia* 等牙周致病菌能通过诱导细胞 MMPs 的分泌,降解 AS 斑块的纤维帽物质,造成纤维帽变薄、斑块破裂。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

五、早产、低体重新生儿与牙周微生态

早产通常指在28～37孕周之间的提前分娩。早产常可导致新生儿体重过低、发育不全及发育障碍，甚至新生儿死亡。一般将出生时体重低于2500g的新生儿定义为早产低出生体重儿(preterm low birth weight，PLBW)。2006年，美国的统计数据显示PLBW占新生儿比例的12.8%，新生儿阶段PLBW死亡的风险是正常新生儿的近40倍。我国孕产妇早产占分娩总数的5%～15%，约15%的PLBW于新生儿期死亡。因此，预防早产对于降低新生儿死亡率、提高新生儿素质非常重要。

专科医生可通过孕产妇和胎儿的临床表现判断出约20%的早产风险因素，如妊娠性高血压、子宫畸形、胎儿宫内窒息等。但更多的PLBW与自发性胎膜早破有关。导致自发性早产的原因大致可被归为三类：环境压力和生活习惯、基因和遗传因素、感染及炎症。其中子宫内微环境的感染和炎症反应被认为是自发性早产的最主要原因之一。细菌性阴道炎是育龄妇女最常见的生殖道疾病之一。阴道内的常驻益生菌可被阴道加德纳菌、厌氧菌属如普雷沃菌、拟杆菌属、消化链球菌属、卟啉菌属、动弯杆菌属等替代。细菌性阴道炎是早产、胎膜早破和PLBW的已知危险因素。患有细菌性阴道炎的早产妇女的羊水细菌培养结果多为阳性，而在培养阳性的羊水中最常分离出的细菌为*F. nucleatum*。尽管从细菌性阴道炎患者的阴道菌群中能鉴定出*F. nucleatum*，但*F. nucleatum*为一种口腔中，特别是牙周病患者龈下菌斑中最常见的菌种。因此，学者们推测*F. nucleatum*可能经由血液循环从远端器官到达了子宫内环境。Hell GB比对了口腔中、阴道中和早产妇女羊水中分离的*F. nucleatum*菌属，结果证实羊水中的*F. nucleatum*更接近于口腔内定植的*F. nucleatum*。在早产妇女的羊水中也分离到阴道中罕见而常见于口腔的二氧化碳噬纤维菌属和伯杰菌属。因此，越来越多的研究开始关注牙周感染与孕产妇早产及PLBW的潜在关联。

进一步的动物实验发现将牙周可疑致病菌*P. gingivalis*经皮下接种孕期大鼠后，可在孕鼠的肝脏、脾脏和胎盘中检测到细菌。将*F. nucleatum*经尾静脉反复注射入孕鼠体内来模拟牙周感染导致的菌血症后发现：*F. nucleatum*呈器官特异性，仅转移至胎盘组织中。*F. nucleatum*为一种宿主细胞侵入型细菌，菌体表面的黏附素FadA蛋白在细菌穿过内皮细胞定植入胎盘的过程中发挥重要作用。Han YP等发现将*F. nucleatum*野生株、*fadA*基因缺陷株注射入怀孕大鼠的尾静脉，6小时后均可在胎盘内发现数量相似的两种细菌，说明这两种细菌的注射浓度一致，且短期内的存活能力相似；注射后24小时，*fadA*基因缺陷株在胎盘内的定植数量显著降低，与野生株相比较下降了近1000倍。提示了黏附素FadA在*F. nucleatum*定植和存活于胎盘中的重要作用，且FadA介导的*F. nucleatum*侵入作用与胎盘内皮细胞TLR4受体的激活密切相关。收集了慢性牙周炎患者PD≥7mm牙周袋内的龈下菌斑样本，经鉴定显示菌斑样本包括了分属20个种属的54种微生物，常见菌属依次为：*F. nucleatum*(17%)、纤毛菌属(12%)、普雷沃菌属(11%)、卟啉菌属(9%)、链球菌属(7%)、月形单胞菌属(7%)和奈瑟菌属(5%)。将龈下菌斑样本经鼠尾静脉接种于孕鼠后，在大鼠胎盘中发现了多种细菌，再次证实牙周微生物能够经血液循环到达子宫内环境，导致子宫内微环境呈现感染状态。

除了细菌感染能引起早产风险增加外，研究发现早产妇女也可呈现为亚临床的感染状态，即并未在局部发现明显的微生物感染。例如，绒毛膜羊膜炎是另一种可导致早产和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

PLBW 的疾病，部分患有绒毛膜羊膜炎的早产妇女的细菌培养结果却为阴性，提示子宫内环境的局部感染并不是早产的唯一感染炎症源。前列腺素 PGE_2 在妇女羊水破裂和宫缩的过程中十分重要。正常情况下，羊膜稳步表达 PGE_2 直至一定阈值后启动分娩。感染可能引起 PGE_2 的水平在未足月时就显著升高至临界值，从而引起早产。此外，很多炎症细胞因子和急性期蛋白也发挥类似的功能。革兰阴性菌的 LPS 是 PGE_2 和炎症介质的有效诱导因子，而与牙周病相关的龈下菌斑生物膜主要由革兰阴性菌组成，且牙周炎症能导致患者局部和全身血液循环中炎症介质水平升高，因此牙周炎可能通过促进炎症介质的表达间接增加了孕妇早产的风险。这一推测在一项非洲狒狒动物实验中得到了很好的论证。研究共纳入了 168 只狒狒为实验组、120 只为对照组。分别在基线、孕中第 3 个月、产后 2～10 天对实验动物进行牙周临床检查，并收集血清进行牙周致病菌 IgG 抗体和各种炎症介质水平的分析。实验动物组则在基线和孕中通过栓丝构建牙周炎模型。结果发现牙周炎组的炎症介质水平明显发生变化，其中 PGE_2 和细菌渗透诱导因子（bactericidal permeability inducing factor，BPI）比基线时显著升高，*F. nucleatum*、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans* 和 *Campylobacer rectus* 的血清抗体与炎症介质水平的变化具有相关性。

流行病学调查进一步证实了牙周感染与早产和 PLBW 之间的关系。早在 1996 年 Offenbacher 等就通过纳入 124 例孕产妇的病例对照研究发现，当矫正了其他危险因素后，患有重度牙周炎的妇女分娩 PLBW 的风险增加了 7.5 倍。另一项横断面研究也显示分娩 PLBW 的妇女检出 *P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*、*T. forsythia*、*Treponema denticola* 的水平明显高于正常组，其龈沟液中 PGE_2 和 IL-1 水平也更高；并且，生产头胎妇女的龈沟液中 PGE_2 的水平与新生儿的体重呈负相关性，龈沟液中 PGE_2 水平越高，新生儿体重越轻、早产的几率越大；GCF 中 IL-1 和 PGE_2 的水平还和羊膜内 IL-1 和 PGE_2 的水平直接相关。通过牙周治疗干预是否会减少孕产妇早产和分娩 PLBW 的风险呢？多项研究已得出了肯定的答案，且一项发表于 2008 年的 meta 分析的研究结论为妊娠期间进行 SRP 可显著降低早产和 PLBW 的风险。2009 年，Randanai 等通过严格排除早产或流产病史、吸烟、酗酒、滥用药物以及营养不良因素，筛选了一群有早产威胁且怀孕前存在局限性慢性牙周炎的妊娠妇女，研究组对其中 41 人进行了牙周治疗，另 42 人设为对照，结果再次证实治疗组早产率明显低于对照组，新生儿体重明显高于对照组。最新的两篇文章在进行了大样本量、多中心的流行病学调查后却又得出了相反的结论。因此，有关牙周炎与早产和 PLBW 的关系还有很多值得探讨的细节。

第六节　牙周病临床治疗与牙周微生态的关系

牙周病发生的始动因子是定植在龈下菌斑生物膜的微生物，因此临床治疗的首要目标为菌斑控制。尽管数以万计的文献已报道了不同治疗方法对牙周感染的控制效果，但目前临床广泛应用的仍然是牙周经典的序列治疗方式。牙周序列治疗以机械性菌斑清除治疗为主，主要包括：龈上洁治术、龈下刮治和根面平整术、牙周清创类手术；根据患者治疗后再评估的结果辅以药物治疗。

牙周临床治疗和牙周微生态之间存在相互影响的关系，即临床治疗将改变牙周微生态的组成，牙周微生态状况也会对临床治疗的效果产生影响。为了系统评估牙周临床治疗与牙周微生态的关系，美国 Forsyth 中心牙周病学科进行了 17 项长期纵向的大样本量

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

临床研究和综合分析。这 17 项研究分别在 SRP 后合并采用了不同的临床治疗方案，包括改良 Widman 翻瓣术、根向复位瓣术、口服抗生素（如阿莫西林、甲硝唑、多西环素、阿奇霉素）、口服小剂量强力环素、局部应用四环素、牙周冲洗。在牙周病患者接受不同治疗前、治疗后的不同时间点进行牙周临床指标的测量，并同期收集受试者龈下全部位点的混合菌斑样本进行 DNA-DNA 棋盘杂交技术鉴定，来分析龈下微生物种属与牙周临床治疗效果的相关性。

Forsyth 中心最终纳入了 493 名受试者的 68 385 个位点，在接受牙周基础治疗及不同的手术或药物治疗后，这些牙周病患者的受试位点牙周探诊深度（probing depth，PD）从基线时到治疗后 12 个月平均减少了（0.59±0.03）mm，附着水平（attachment level，AL）平均获得（0.20±0.02）mm。基线时牙周袋越深、附着丧失越严重的位点治疗后的变化越明显；并且约有 11.4% 的受试者接受治疗后 PD 仍然进一步加深，发生位点附着丧失的比例为 32.5%（图 12-9）。

分析龈下混合菌斑细菌总量与牙周临床治疗的关系后发现：这些不同的治疗方案均使细菌总量在治疗后 3 个月明显下降，且这一下降趋势一直持续到治疗后的 12 个月，不同时间点（0、3、6、12 个月）的细菌总量（单位：$\times 10^5$±标准差）分别为 54.6±2.6、39.3±2.0、39.1±2.4、39.3±2.5（$P<0.001$）。另一项纳入了 169 名慢性牙周炎患者的长达 24 个月的纵向研究也得出了类似的结果，牙周致病菌 *P. gingivalis* 和 *T. forsythia* 的水平持续下降，*T. denticola* 和缠结真杆菌虽在后期有所升高，但检测水平仍然低于基线。Forsyth 中心进一步分析受试

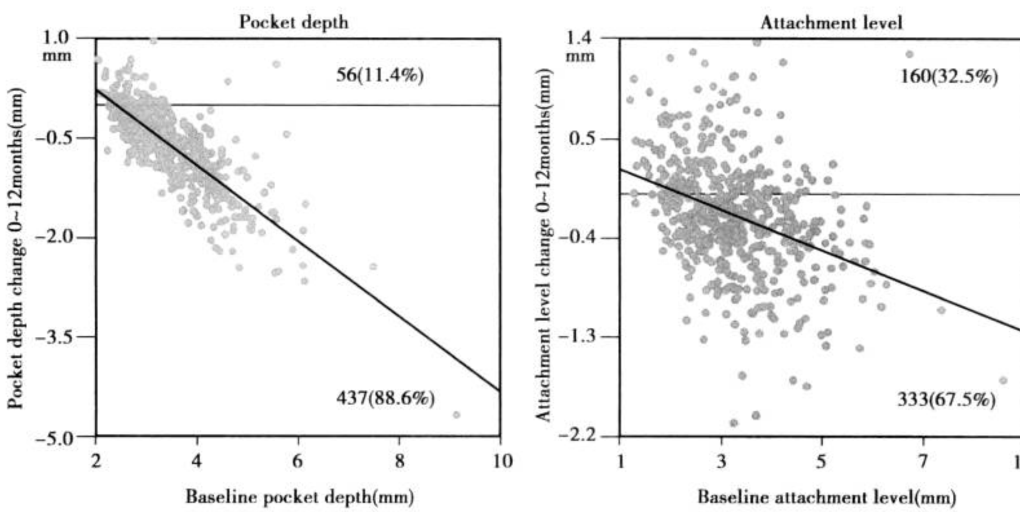


图 12-9　493 名受试者在接受牙周基础治疗及不同的手术或药物治疗后，68 385 个受试位点牙周探诊深度和附着水平的变化

注：基线牙周袋深度平均值 vs 牙周袋深度变化的平均值（左）；基线附着水平平均值 vs 附着水平变化平均值（右）。以 X 轴为基线牙周探诊深度或附着水平的平均值，Y 轴为从基线到治疗后 12 个月该参数的平均变化值，绘制每位受试者的圆点。圆点位于水平横线以上提示：受试者牙周探诊深度增加或持续附着丧失；水平线以下提示：治疗后 12 个月牙周探诊深度减少或附着获得，约 88.6% 的受试者 PD 值减少，67.5% 附着获得。图片来自：Anne D Haffajee，Ricardo P Teles，Sigmund S Socransky. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival mcrobiota. Periodontology 2000，2006，42：219-258. P224，Fig 9

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

者治疗前后12个月的龈下不同种类细菌的具体变化后显示，*P. gingivalis*、*P. intermedia*、变黑普氏菌和牙龈二氧化碳噬纤维菌(*Capnocytophaga gingivalis*)明显减少，而戈氏链球菌、口腔链球菌、缓症链球菌、齿蚀艾肯菌、黏液奈瑟菌、麻疹双球菌逐渐增加；*T. forsythia* 在治疗后3个月明显减少，随后缓慢增加；*F. nucleatum* 则在治疗后呈现短暂下降、最终回升至基线水平的趋势。以上研究均证实牙周临床治疗会对牙周微生态组成产生一定影响，使其向有利于菌斑控制和牙周健康的状态发展。

牙周微生态的自身状况是否会对临床治疗疗效产生影响？Forsyth中心的深入分析为我们提供了一定的线索。研究人员首先根据基线时牙周探诊深度将检测位点的牙菌斑进行了分组，发现：基线时PD越小的位点，不同种属细菌的数量越少；不同PD分组中红色和橙色复合体的细菌都呈现出治疗后细菌数量下降的趋势，但PD4～6mm组数量下降的细菌种类明显多于PD>6mm组。应用基线时探诊出血情况将这些位点再次分组显示：基线时红色和橙色复合体的细菌量与BOP阳性率呈正相关性；牙周治疗使两组的细菌总量均有显著下降，但BOP阳性位点的一些菌种（如 *P. gingivalis*、*T. forsythia*、*P. intermedia* 和变黑普氏菌）回升的速度明显增快，而小韦荣菌、纤细弯曲菌和有害新月形单胞菌12个月之后超过了基线

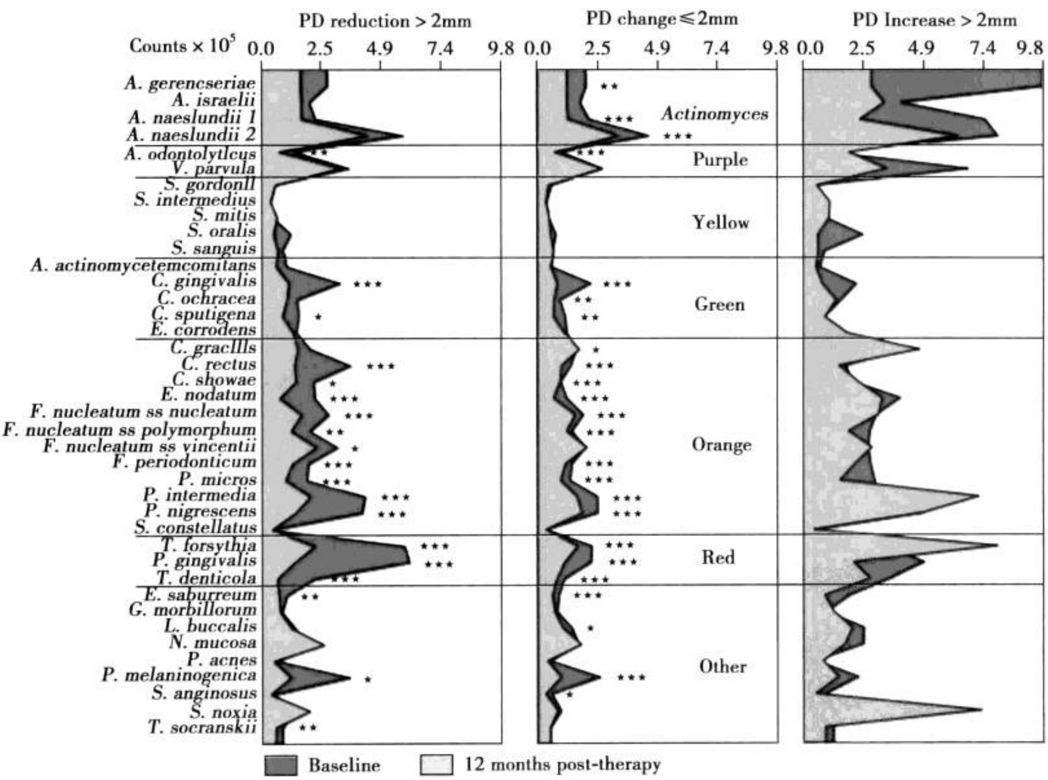


图12-10 461名慢性牙周炎患者龈下菌斑中40种牙周致病微生物分别在基线、治疗后12个月期间的细菌计数变化与探诊深度的相关性($\times 10^5$，平均值±标准差)

注：* $P<0.05$；* * $P<0.01$；* * * $P<0.001$。该图片摘自：Anne D Haffajee, Ricardo P Teles, Sigmund S Socransky The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival mcrobiota. Periodontology 2000, 2006, 42: 219-258. P235, Fig 22

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

水平。说明牙周微生态状况的确会对牙周临床治疗疗效产生影响。

临床治疗可以改善牙周临床指标，且微生态状态会影响牙周治疗效果的观点已毋庸置疑，然而改善的临床指标是否与降低的微生物数量存在直接相关性？深入分析认为，并不是所有种类的微生物数量降低都与牙周临床指标改善有关。*P. gingivalis*、*T. forsythia*、牙龈二氧化碳噬纤维菌数量的直接减少，*T. forsythia*、牙龈二氧化碳噬纤维菌和红色复合体在菌斑生物膜中所占比例减少，或 *A. actinomycetemcomitans*、牙龈二氧化碳噬纤维菌、*P. intermedia*、*F. nucleatum*、变黑普氏菌、*T. forsythia*、*P. gingivalis*、*Treponema denticola*、齿蚀艾肯菌、溶齿放线菌定植位点的百分比下降都与 PD 降低有关。*T. forsythia* 和 *P. gingivalis* 数量减少，红色复合体在菌斑生物膜中所占比例减少，定植 *T. forsythia* 和 *P. gingivalis* 位点数量减少都与附着再获得有关。如图 12-10、12-11 所示，根据 PD 或 CAL 不同变化对受检位点分组后，发现：临床指标改善的组能够明显观察到治疗对细菌总量的影响，且红色和橙色复合体细菌的数量显著下降；放线菌和二氧化碳噬纤维菌属、产黑色素普氏菌、砂优杆菌的数量也有所下降。在治疗效果不佳的组却未观察到这一现象。牙周微生态中红色和橙色复合体的数量变化与牙周临床指标改善关系密切。

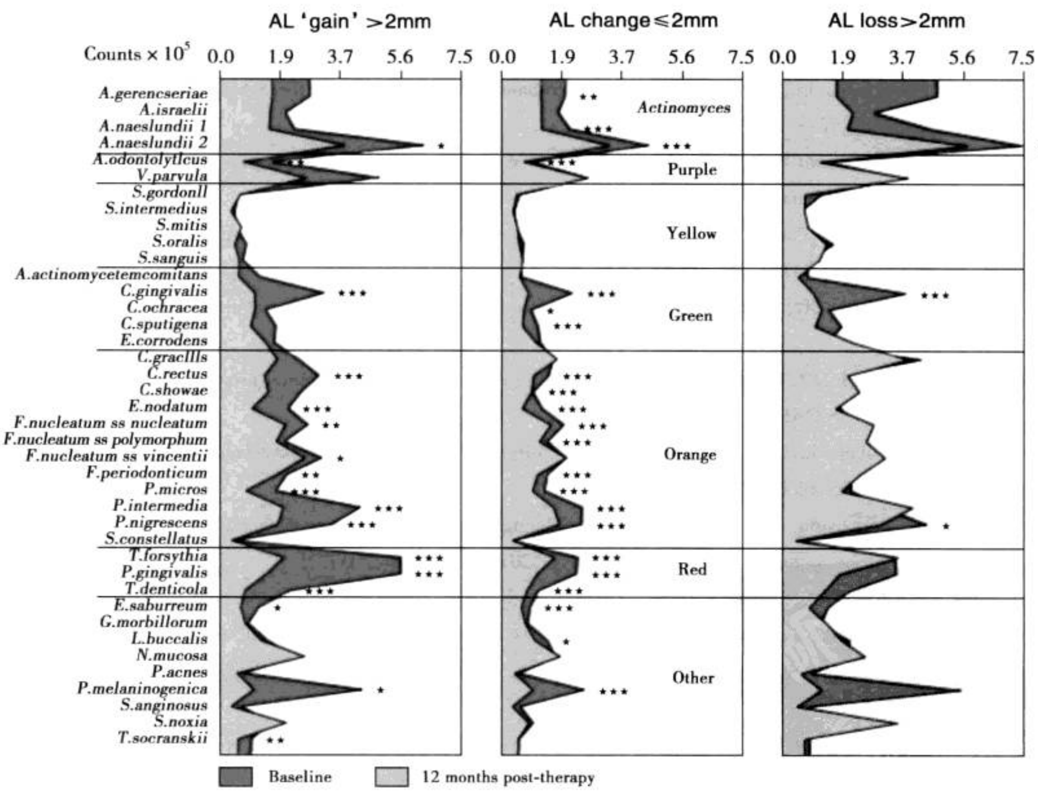


图 12-11　461 名慢性牙周炎患者龈下菌斑中 40 种牙周致病微生物分别在基线、治疗后 12 个月期间的细菌计数变化与附着丧失的相关性（×10^5，平均值±标准差）

注：* $P<0.05$；** $P<0.01$；*** $P<0.001$。该图片摘自：Anne D Haffajee, Ricardo P Teles, Sigmund S Socransky The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival mcrobiota. Periodontology 2000, 2006, 42: 219-258. P233, Fig 20

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

世界牙周病学界对牙周机械治疗的同时是否应配伍抗菌药物一直存在争议。一些学者认为机械治疗可基本达到菌斑控制的目的，抗菌药物只应在机械治疗效果不佳的情况下再选择使用。另一些学者则认为同期辅以药物治疗将更彻底地清除细菌，巩固机械治疗的效果。为解答这一疑问，Forsyth 中心比较了 17 种采用不同治疗方案的研究，结果发现同期应用全身或局部抗菌药物的实验组 PD 减少程度和 AL 获得程度明显优于未应用药物组。治疗前后 12 个月应用药物组的 PD 减少(0.66±0.65)mm，未应用药物组为(0.54±0.57)mm($P<0.05$)，AL 获得分别为(0.31±0.46)mm 和(0.08±0.57)mm($P<0.001$)。进一步分析抗菌药物应用与否对牙周治疗效果的影响，显示未应用抗菌药物的受试者发生临床指标恶化的风险更大。应用抗菌药物与否会对龈下菌斑微生物造成怎样的影响？牙周机械性治疗均可降低不同种类龈下微生物数量的下降，但应用药物组细菌数量下降的种类更多、下降幅度更明显。

（徐圪　赵蕾）

参考文献

1. 孟姝，吴亚菲，杨禾. 伴放线菌聚集杆菌产生的细胞膨胀致死毒素及其与牙周病的关系. 国外医学(口腔医学分册)，2005，32：458-460
2. Adriaens LM, Alessandri R, Spörri S, et al. Does Pregnancy Have an Impact on the Subgingival Microbiota? J Periodontol, 2009, 80: 72-81
3. Andriankaja O, Trevisan M, Falkner K, et al. Association between periodontal pathogens and risk of nonfatal myocardial infarction. Community Dent Oral, 2011, 39: 177-185
4. Bagaitkar J, Deap CA, Patel CK, et al. Tobacco smoke augments *Porphyromonas gingivalis-Streptococcus gordonii* biofilm formation. PLoS ONE, 2011, 6: e27386
5. Bagaitkar J, Demuth DR, Scott DA. Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection. Tob Induc Dis, 2008, 4: 12
6. Bagaitkar J, Demuth DR, Daep CA, et al. Tobacco upregulates *P. gingivalis* fimbrial proteins which induce TLR2 hyposensitivity. PLoS ONE, 2010, 5: e9323
7. Bagaitkar J, Williams LR, Renaud DE, et al. Tobacco-induced alterations to *Porphyromonas gingivalis*-host interactions. Environ Microbiol, 2009, 11: 1242-1253
8. Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. J Periodontal Res, 2013, 48: 30-36
9. Casain RC, Duarte PM, Santos VR, et al. Influence of glycemic control on Epstein-Bar and Cytomegalovirus infection in periodontal pocket of type 2 diabetic subjects. Arch Oral Biol, 2010, 55: 902-906
10. Cullinan MP, Ford PJ, Seymour GJ. Periodontal disease and systemic health: current status. Aust Dent J, 2009, 54: S62-69
11. Dickinson BC, Moffatt CE, Hagerty D, et al. Interaction of oral bacteria with gingival epithelial cell multilayers. Mol Oral Mocrobiol, 2011, 26: 210-220
12. Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, et al. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. J Periodontol, 2008, 79: 637-646
13. Ebersole JL, Steffen MJ, Holt SC, et al. Systemic inflammatory responses in progressing periodontitis during pregnancy in a baboon model. Clin Exp Immunol, 2010, 162: 550-559
14. Edward JO, Mary PC, Jonathan WL. Diabetes, periodontitis, and the subgingival microbiota. J Oral Microbiol,

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

2010,2:5818
15. Fardini Y, Chung P, Dumm R, et al. Transmission of Diverse Oral Bacteria to Murine Placenta: Evidence for the Oral Microbiome as a Potential Source of Intrauterine Infection. Infect Immun, 2010, 78: 1789-1796
16. Figuero E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. J Periodontol, 2011, 82: 1469-1477
17. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* as an early colonizer of oral tissues: epithelium as a reservoir? J Clin Microbiol, 2010, 48: 4464-4473
18. Gursoy M, Haraldsson G, Hyvonen M, et al. Does the frequency of Prevotella intermedia increase during pregnancy? Oral Microbiol Immunol, 2009, 24: 299-303
19. Haffajee AD, Teles MR, Song PX, et al. Factors affecting supragingival biofilm composition. I. Plaque mass. J Periodontal Res, 2009, 44: 511-519
20. He X, Zhou X, Shi W. Oral Microbiology: Past, Present and Future. Int J Oral Sci, 2009, 1: 47-58
21. Jinadasa RN, Bloom SE, Weiss RS, et al. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. Microbiology, 2011, 57: 1851-1875
22. Kachlany SC. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. J Dent Res, 2010, 89: 561-570
23. Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gum Bug, Leave My Heart Alone!"-Epidemiologic and Mechanistic Evidence Linking Periodontal Infections and Atherosclerosis. J Dent Res, 2010, 89: 879-902
24. Kesic L, Milasin J, Igic M, et al. Microbial Etiology of Periodontal Disease: MiniReview. Med Biol, 2008, 15: 1-6
25. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, et al. Changes in Periodontal Health Status Are Associated with Bacterial Community Shifts as Assessed by Quantitative 16S Cloning and Sequencing. J Clin Microbiol, 2006, 44: 3665-3673
26. Kumari M, Savitha BN, Namita S, et al. Diabetes and periodontitis: a casual link or a two way street? AOSR, 2011, 1: 221-227
27. Lakio L, Lehto M, Tuomainen AM, et al. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Endotoxin Res, 2006, 12: 57-64
28. Li L, Michel R, Cohen J, et al. Intracellular survival and cascular cell to cell transmission of *Prophyromonas gingivalis*. BMC Microbiol, 2008, 8: 26
29. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, et al. Births: final data for 2006. Natl Vital Stat Rep, 2009, 57: 1-102
30. Meng S, Zhang L, Zhao L, et al. Effect of C-reactive protein on CC chemokine receptor 2-mediated chemotaxis of monocytes. DNA Cell Biol, 2012, 31: 30-35
31. Miao D, Fenno JC, Timm JC, et al. The *Treponema denticola* chymotrypsin-like protease dentilisin induces matrix metalloproteinase-2-dependent fibronectin fragmentation in periodontal ligament cells. Infect Immun, 2011, 79: 806-811
32. Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, et al. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. J Periodontol, 2007, 78: 2289-2302
33. Nowakowska D, Kurnatowska A, Stray-Pedersen B, et al. Species distribution and influence of glycemic control on fungal infections in pregnant women with diabetes. J Infect, 2004, 48: 339-346
34. Pollanen MT, Laine MA, Ihalin R, et al. Host-Bacteria Crosstalk at the Dentogingival Junction. Int J Dent, 2012, 2012: 821383
35. Sigusch B, Beier M, Klinger G, et al. A 2 step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. J Periodontol, 2001, 72: 275-283
36. Tanner AC, Paster BJ, Lu SC, et al. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. J Dent Res,

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

2006,85:318-323

37. Tanner AC, Izard J. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. Periodontol 2000, 2006:88-113

38. Ueno Y, Ohara M, Kawamoto T, et al. Biogenesis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin holotoxin. Infect Immun, 2006, 74:3480-3487

39. Yokoyama M, Hinode D, Yoshioka M, et al. Relationship between *Campylobacter rectus* and perio-dontal status during pregnancy. Oral Microbiol Immunol, 2008, 23:55-59

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第十三章 口腔黏膜病与微生态

口腔黏膜微生态系是由口腔黏膜、口腔黏膜表面的正常微生物群、口腔中的唾液所构成。口腔中有较多细菌、真菌等微生物，它们相互依存并相互制约，并且与宿主口腔黏膜及含有唾液的口腔环境之间相互影响，共同维持着口腔黏膜微生态的平衡。

第一节 口腔黏膜微生态系统

口腔黏膜微生态系统的平衡和稳定是保护口腔黏膜免受微生物侵袭的重要条件，构成口腔黏膜微生态系统的任一部分出现问题，均可导致该微生态系统失衡，引起多种口腔黏膜疾病。

一、口腔黏膜微生态系统的构成

（一）口腔黏膜

口腔黏膜包括唇、颊、腭、舌和牙龈。口腔黏膜是指口腔内的湿润衬里，从表及里，口腔黏膜由上皮层、基底膜、固有层和黏膜下层所组成。上皮层由角质形成细胞与非角质形成细胞构成，为复层鳞状上皮。根据在口腔内部位的不同，口腔黏膜上皮可分为角化、不全角化或无角化型等几类。以角化型上皮为例，由上皮的浅面至深面可分为角化层、粒层、棘层及基层四层。

口腔黏膜表面上皮具有持续脱落再生的特性。黏膜上皮的这种快速新陈代谢使在黏膜表面定植的微生物将不断地经历吸附-再吸附的定植过程，从而影响口腔黏膜微生态系中微生物的定植数量。

（二）口腔黏膜微生物群

根据口腔黏膜的不同部位，口腔黏膜菌群可分为唇黏膜菌群、舌菌群、颊黏膜和腭黏膜菌群。唇黏膜的红唇与外界相同，其细菌组成与皮肤菌群相似，主要是一些需氧菌和兼性厌氧菌，如表型葡萄球菌、棒杆菌、微球菌；唇内侧黏膜与牙面接触并受唾液菌群的影响较大，细菌组成主要是口腔链球菌群、奈瑟菌、放线菌、龋齿罗氏菌。

舌黏膜的舌背和舌腹部菌群存在较大的差异，舌背含有丰富的乳头，解剖结构复杂，易滞留细菌，优势菌主要是链球菌属（唾液链球菌、草绿色链球菌）和韦荣菌属，其他检出率较高的细菌包括消化链球菌属、放线菌属、拟杆菌属、普氏菌属等；舌腹部是光滑的黏膜表面，与唾液接触密切，受唾液菌群影响，其常居菌波动较大。颊黏膜与腭黏膜的菌群主要以口腔

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

链球菌、龋齿罗斯菌、颊纤毛菌和口腔普氏菌多见。

在各部位口腔黏膜上均可检出真菌，主要是白假丝酵母菌（白色念珠菌）。白假丝酵母菌在健康成人口腔的检出率可达30%～35%，在新生儿的口腔中亦有较高的检出率。白假丝酵母菌是口腔黏膜微生物相关性疾病的主要病原菌，在口腔黏膜的主要定植部位是颊黏膜及腭黏膜等。

（三）口腔黏膜生物膜

生物膜（biofilm）是依附于某载体表面的由胞外多聚物和基质网包被的高度组织化、系统化的微生物生物膜。近年来，生物膜在口腔黏膜慢性感染性疾病中的作用逐渐引起了研究者的关注。研究内容主要集中于白假丝酵母菌生物膜形成的机制以及混合生物膜中白假丝酵母菌与其他微生物的相互作用两个方面。

白假丝酵母菌可在人口腔黏膜、大鼠舌黏膜表面形成生物膜（图13-1）。与细菌生物膜相似，白假丝酵母菌生物膜的形成始于白假丝酵母菌对表面的黏附，随后逐渐发展成为由菌体、芽管和菌丝组成，细胞外多糖包裹的三维复杂结构。研究发现，转录因子Bcr1、黏附素Hwp1和Als3、菌相转换基因*Hyr1*等与白假丝酵母菌生物膜形成密切相关。

在口腔微生态环境中，白假丝酵母菌多数情况下是作为混合生物膜的一部分。在一些

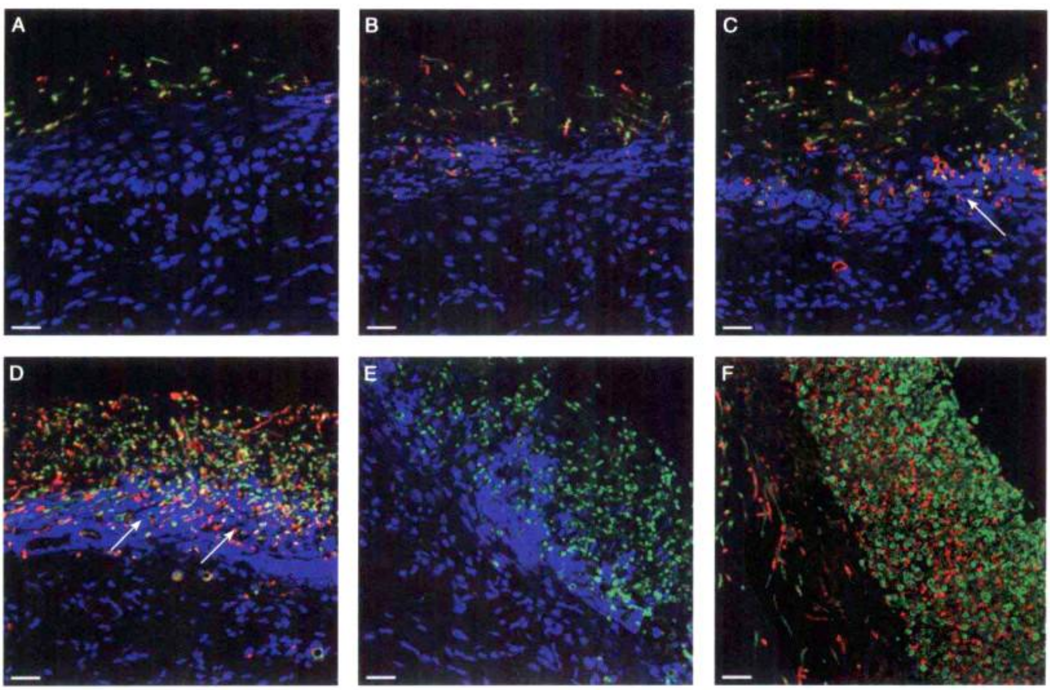


图13-1　共聚焦显微镜下观察口腔黏膜表面不同阶段的白假丝酵母菌生物膜

注：白假丝酵母菌由抗念珠菌多克隆抗体标记（绿色）；细胞外基质-葡聚糖由BFDiv单克隆抗体标记（红色）；组织细胞核由核染色剂TO-PRO-3标记（蓝色）。A～D：大鼠口腔白假丝酵母菌感染动物模型组织切片；F：重组人口腔黏膜；E：BFDiv抗体的IgM免疫球蛋白同型对照。图片来自：Dongari-Bagtzoglou A，Kashleva H，Dwivedi P，et al. Characterization of Mucosal Candida albicans Biofilms. PLoS One，2009，11（4）：e7967. doi：10.1371/journal.pone.0007967

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

体外的混合生物膜模型研究中，研究发现，嗜热链球菌、变异链球菌、铜绿假单胞菌、乳酸杆菌属等对白假丝酵母菌具有拮抗作用，主要表现为对白假丝酵母菌生长和假菌丝形成的抑制，而格氏链球菌则可促进白假丝酵母菌假菌丝的形成。同时，白假丝酵母菌可促进一些细菌，如表皮葡萄球菌、黏滞沙雷菌的黏附和生物膜的形成。其他念珠菌如都柏林念珠菌、克柔念珠菌与白假丝酵母菌之间可互相抑制，可能与其对黏附位点和营养的竞争有关。

口腔黏膜生物膜的形成，为微生物提供了一个相对独立的环境，使其对宿主的防御机制和药物作用的抵抗能力增强，与口腔黏膜慢性感染性疾病的迁延和复发密切相关。

（四）唾液

唾液是一种无色透明的稀薄液体，主要由腮腺、下颌下腺、舌下腺以及无数个小唾液腺共同分泌。唾液的主要成分是水，约占总量的99%左右，剩余的1%由黏液、电解质、糖蛋白、各种酶以及抗生素等组成。正常人每天分泌唾液1000～1500ml，静息时流量约为0.5ml/min，大部分随吞咽动作进入消化道，正常口腔中保持0.5～1ml唾液。唾液进入口腔，脱落黏膜上皮细胞、白细胞、微生物和食物残渣混入其中，使唾液成为口腔微生物群定植的重要生态区。因其直接与口腔黏膜接触，成为口腔黏膜微生态系统的重要组成部分。

二、口腔黏膜微生态系统的特点

口腔黏膜与外界直接相通，极易接触外在环境中的致病微生物；同时，口腔黏膜表面本身也定植了大量的微生物，受到微生物感染的风险较高。与口腔其他部位，如牙体组织或牙周组织相比较，口腔黏膜的微生物感染并不常见，多数是由于局部环境改变或机体免疫功能受损后，条件致病菌大量增殖引发的机会感染。口腔黏膜微生态系统的3个组分，在维护黏膜表面的微生态平衡、保护机体抵抗致病微生物侵袭中均发挥了重要作用（图13-2）。

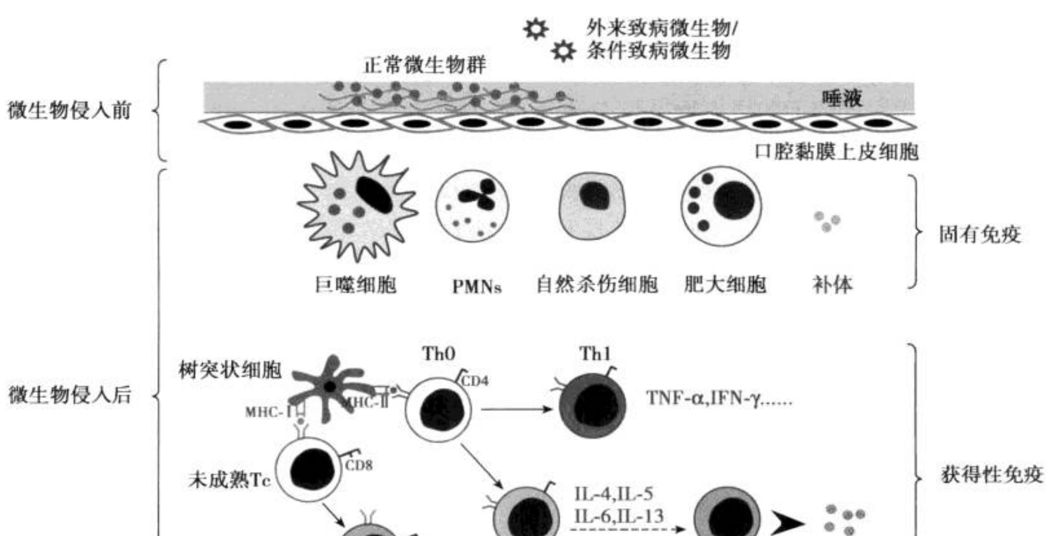


图13-2　口腔黏膜微生态系统防御微生物入侵的机制示意图

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（一）正常微生物群的保护作用

正常微生物群定植于口腔黏膜表面，从食物残渣和唾液中获取营养，维持自身的代谢和增殖。由于微生物之间的相互制约以及机体防御机制的影响，这些微生物并不会过度增殖。以白假丝酵母菌为主的各种念珠菌是口腔黏膜微生物相关性疾病的主要病原菌，在生理状态下是正常微生物群的组成部分，其增殖和定植受到口腔细菌的抑制。使用广谱抗生素后，细菌生长受抑，对白假丝酵母菌的抑制作用减弱，从而引起白假丝酵母菌机会感染。

除了对白假丝酵母菌等条件致病菌的抑制外，正常微生物群的存在可以优先占据口腔黏膜表面的定植部位和营养物质，对外来致病微生物起到抑制作用；部分微生物可分泌具有抗菌作用的物质，如唾液链球菌、血链球菌等产生的过氧化氢可抑制乳杆菌属、白喉棒状杆菌等。正常微生物群的存在还可以刺激机体的免疫反应，以增强机体抵抗外来刺激的能力。

（二）唾液屏障功能

在口腔黏膜微生态系统中，唾液是微生物定植的重要生态区，却也成为维护口腔黏膜的第一道屏障。唾液更新速度快，并处于流动状态，可使未附着于口腔黏膜的细菌被清洗出口腔。唾液对口腔黏膜的机械冲洗作用，排除有毒物质，使微生物不致附着于黏膜表面形成克隆，阻断了微生物致病的首要及关键步骤。

唾液中含有多种具有抗微生物作用的分子，主要来源于唾液腺上皮、口腔黏膜上皮以及免疫细胞，对细菌、真菌和病毒等微生物均有不同程度的抑制作用。唾液中常见的抗微生物效应分子包括黏蛋白、富组蛋白、钙卫蛋白、乳铁蛋白、防御素、凝集素、过氧化物酶、溶菌酶、免疫球蛋白 A 以及分泌型白细胞蛋白酶抑制剂等（表 13-1）。

（三）口腔黏膜屏障功能

1. 上皮屏障　完整的黏膜上皮是阻止异物、微生物进入深层组织的天然生理屏障。角化上皮角化的表层降低了黏膜表面的通透性，防止微生物的渗透。上皮表层的脱落更替，也使黏附于口腔黏膜表面的微生物得到清除。口腔黏膜上皮内还存在一种上皮内屏障，主要由上皮细胞成熟过程中所排出进入细胞外间隙的膜被颗粒组成。

在角化的口腔上皮，膜被颗粒与细胞膜连接，伸长形成一系列平行的板层结构。在非角化的口腔上皮，膜被颗粒以一种密集非层状中心轴的形式循环排列。基底膜复合物构成了有选择通透性的大分子物质滤过性屏障。口腔黏膜上皮细胞也可通过分泌防御素、钙卫蛋白等，防止微生物的入侵。

2. 免疫细胞屏障　口腔黏膜上皮内本身存在少量的免疫细胞，包括中性多形核细胞（polymorphonuclear neutrophils，PMNs）、巨噬细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞等。在微生物入侵的早期，PMNs 和巨噬细胞可迅速将其吞噬并利用胞内的溶酶体酶将其杀死，PMNs 还可释放胞外杀菌网络（neutrophil extracellular traps），该网络由核酸物质和抗微生物蛋白组成，在捕杀微生物的同时，减少对宿主细胞的损害；自然杀伤细胞可识别受到感染的细胞，与该细胞接触后，通过释放穿孔素、肿瘤坏死因子等，直接裂解感染细胞或诱发感染细胞凋亡。

肥大细胞在接触到激活的补体分子或某些抗原抗体复合物后可迅速脱颗粒，释放组胺，使血管通透性增加，引发急性炎症反应。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表 13-1　唾液中的抗微生物效应分子

效应分子	英文名称	来　源	作用机制
黏蛋白	mucin	唾液腺黏液性腺泡	润滑、抗干燥、调节微生物黏附、降低真菌细胞膜稳定性
富组蛋白	histatins	唾液腺上皮	中和细菌产酸；抑制细菌生长；诱发真菌细胞内部 ATP 外流，使其能量衰竭
钙卫蛋白	calprotectin	口腔黏膜上皮、中性粒细胞、单核细胞	与锌离子结合，剥夺细菌和真菌生长必需的锌；抑制真菌菌丝形成
乳铁蛋白	lactoferrin	唾液腺上皮、中性粒细胞、单核细胞	与铁离子具有高亲和性，与细菌和真菌生长必需的铁
防御素	defensins	唾液腺上皮、口腔黏膜上皮	裂解细菌、真菌细胞膜；抑制病毒复制
凝集素	agglutinin	唾液腺上皮	使微生物凝聚，抑制其黏附
过氧化物酶	peroxidase	唾液腺上皮、中性粒细胞、单核细胞	氧化作用，使微生物蛋白质变性
溶菌酶	lysozyme	唾液腺上皮、中性粒细胞、单核细胞	溶解、破坏细菌、真菌细胞壁
分泌型免疫球蛋白 A	secretory immunoglobin A	唾液腺浆液性腺泡	使微生物凝聚，抑制其黏附；使细菌酶和毒素失活；补体活化等
分泌型白细胞蛋白酶抑制剂	secretory leukoprotease inhibitor	口腔黏膜上皮	具有抑制真菌的作用，机制不明

随着微生物的进一步入侵，口腔上皮细胞和上述免疫细胞可产生各种促炎因子和趋化因子，如白介素-1（interleukin-1，IL-1）、IL-8、IL-18、肿瘤坏死因子等，一方面趋化固有层血管内的免疫细胞进入上皮层，另一方面刺激活化进入上皮层的免疫细胞，启动机体的获得性免疫机制，发挥抗微生物效应。在这一阶段，发挥防御作用的主要是树突状细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞等。

树突状细胞（dendritic cell，DC）主要发挥抗原呈递功能，在与抗原（如细菌、病毒蛋白等）接触后，未成熟的 DC 转变成为具有抗原呈递能力的成熟 DC，通过其表面的组织相容性抗原（major histocompatibility antigen，MHC）Ⅰ类和Ⅱ类分子将抗原分别传递给 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞，使这些细胞激活并发挥相应功能。具有抗原呈递功能的细胞还包括巨噬细胞、B 淋巴细胞、某些上皮细胞等。

T 淋巴细胞是机体获得性免疫的重要组成部分，在口腔黏膜抵抗微生物入侵中发挥的作用主要包括以下几个方面：①辅助性 T 细胞（T helper cell，Th）中的 Th1，可激活巨噬细胞，促使巨噬细胞杀灭其胞内吞噬的细菌等微生物；诱导 B 细胞抗体类型转换为 IgG1 或 IgG3。②Th2 可刺激 B 细胞增殖，诱导 B 细胞抗体类型转换为 IgG2、IgA 或 IgE，并增加中和抗体的产量。③细胞毒性 T 细胞（cytotoxic T cell，Tc）可通过穿孔素、肿瘤坏死因子或 Fas 途径等诱

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

发受到病毒感染的宿主细胞凋亡。

B 淋巴细胞可与抗原结合直接活化或在 Th2 细胞的辅助下活化，活化的 B 细胞的主要功能是产生抗体，发挥相应的功能。

3. 抗体和补体　参与口腔黏膜微生物防御的抗体类型主要是 IgA、IgG 和 IgM，作用方式包括以下几个方面：①阻止微生物或其毒性产物与宿主细胞的结合；②与细菌鞭毛结合或使细菌发生凝聚，降低其运动能力；③与补体共同作用，诱导细菌裂解；④与微生物表面结合，使微生物更易被巨噬细胞识别；⑤介导效应细胞结合于微生物表面，通过酶的释放破坏其细胞膜，使其死亡。

补体在口腔黏膜微生物防御方面主要发挥以下作用：①趋化多形核细胞、肥大细胞等，增加血管通透性，诱发炎症反应；②与微生物表面结合，使微生物更易被巨噬细胞识别；③直接裂解某些易感微生物。

三、口腔黏膜微生态系统的影响因素

口腔黏膜微生态系统由口腔黏膜、微生物和唾液共同构成。这三者任何一方受到影响，都将影响整个口腔黏膜微生态系统的平衡。口腔黏膜微生态系统的影响因素众多，包括局部因素和全身因素两个方面。

（一）局部因素

1. 微生物的致病性　微生物的致病性与其运动、黏附、繁殖、对环境的适应以及对宿主防御机制的抵抗能力有关。引起口腔黏膜病的微生物多为条件致病微生物，多为口腔正常菌群的组成部分，在局部微环境改变或机体抵抗能力下降时引起感染。

2. 唾液流量和 pH　唾液的冲刷作用有利于口腔黏膜表面微生物的清除，还可带走微生物生长所需的营养物质，并对细菌产生的酸具有缓冲作用。各种原因引起的唾液流量减少都会增加微生物感染的风险性。唾液 pH 的改变可使其更有利于某些致病微生物的生长。如酸性环境有利于变异链球菌、乳酸杆菌及白假丝酵母菌等的生长。

3. 食物　高糖、高碳水化合物饮食可增加细菌产酸，降低唾液 pH 值，有利于耐酸的微生物的生存。黏性食物可附着于牙齿及口腔黏膜表面，难以被有效清洁。

4. 口腔卫生　口腔卫生措施是去除微生物、维持口腔健康的重要手段。菌斑、牙石等不仅为微生物的生长提供了环境，尖锐的牙石还可能引起黏膜的损伤，更有利于微生物的侵入。

5. 其他因素　如局部佩戴义齿，使微生物的滞留区增加；使用抗菌性漱口水使微生物平衡失调等等。

（二）全身因素

1. 年龄　年龄对口腔微生态系统的影响包括多个方面。首先，口腔微生物的组成并不恒定，而是随着年龄的增长而不断变化，出生时口腔内多无菌，此后来自母体或周围环境中的细菌逐渐定植于口腔内。随着牙齿萌出、饮食结构的改变等等，口腔内的微生物数量和种类都在不断的调整。同时，年龄增长还会引起唾液流量、激素水平以及免疫功能等发生变化，从而改变机体对致病微生物的防御能力。

2. 疾病　生理状态下，唾液、口腔黏膜、免疫细胞、抗体等构成的一系列保护屏障阻挡着微生物的入侵。各种疾病如干燥综合征、营养不良、免疫缺陷和免疫抑制、恶性肿瘤的放

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

化疗等均可引起上述防御机制的一方面或几个方面的削弱，从而导致口腔微生态失衡。

第二节 口腔黏膜病生态病因学说

口腔黏膜病是指发生在口腔黏膜及软组织上的类型各异、种类众多的疾病总称，主要包括口腔黏膜感染性疾病、变态反应性疾病、溃疡类疾病、大疱类疾病、斑纹类疾病、肉芽肿性疾病、唇舌疾病等几大类。以上几类疾病无论是只发生在口腔黏膜的病变还是伴发于其他疾病的口腔表征，均与口腔微生态的异常有着密切的关系。本节主要论述口腔微生态的变化与口腔黏膜病变发生之间的关系问题。

一、口腔菌群失调与口腔黏膜病

菌群失调是指在某一微生境内正常菌群中细菌的种类和数量发生较大幅度变化而超出正常范围的状态，主要是量的变化，又称为比例失调。菌群失调可分为三度：Ⅰ度失调为可逆性失调；Ⅱ度失调是不可逆的，菌群内生理波动转为病理波动；Ⅲ度失调为二重感染，在抗菌药物治疗原感染性疾病过程中，造成体内菌群失调而产生的一种新感染。口腔临床工作中常见的菌群失调为Ⅲ度失调，多发生于应用广谱抗生素、激素及放化疗后。

（一）长期应用广谱抗生素

口腔内有十几种微生物，而微生物的的致病性是相对的，一种病原菌如数量少，就可能不致病；一种非致病菌数量多时，也可能致病。各种致病菌对不同的抗菌药物敏感性不同，尤其是较长期应用广谱抗菌药物后，抗菌药物不仅能抑制或杀死致病菌，也能作用于对抗生素敏感的正常菌群，使正常菌群受到抑制，条件致病或耐药菌大量增殖造成机体二重感染或称菌群交替症，二重感染的致病菌主要有革兰阴性杆菌、真菌（白假丝酵母菌）、葡萄球菌属（如金黄色葡萄球菌），引起的二重感染一般出现于用药后2～3周内，发生率约8%。

（二）激素及放化疗

大量化疗药和激素的应用是患者真菌感染的主要因素。肿瘤患者长期接受化疗，自身白细胞明显减少、质量差，使机体免疫功能下降，易受微生物侵袭，易发生二重感染。激素作为肿瘤辅助用药，削弱患者自身的抗感染能力。由于化疗药和激素应用，使患者免疫功能低下，易发生医院感染及内源性感染。肿瘤患者在接受放疗后，全身免疫系统受到抑制，机体抵抗力下降；口腔黏膜脆性增加，容易破溃。

唾液腺受到放射性损伤，特别是浆液性腺泡组织为纤维组织所代替，导致唾液分泌量明显减少，口腔自洁作用显著降低引起菌群的改变，进而导致感染性疾病的发生。为预防感染的发生而应用抗生素，尤其第三代头孢菌素的应用，使敏感菌株被抗生素杀死、抑制，真菌不断生长繁殖，导致体内菌群失调，继发二重感染。

菌群失调导致的二重感染，在口腔的主要病变表现有：

1. 口腔念珠菌病　是最常见的因二重感染导致的口腔黏膜疾病，其致病菌为假丝酵母菌，是口腔中重要的条件致病性真菌，属于真菌界半知菌亚门-芽胞菌纲-隐球酵母目-隐球酵母科-念珠菌属，是双相型单细胞酵母菌。目前认为至少有7种念珠菌能引起人或动物的感染，白假丝酵母菌主要为内源性感染，其他假丝酵母菌可为多种途径的感染。假丝酵母菌属感染占所有真菌感染的80%。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

根据病变部位不同,可分为念珠菌性口炎、念珠菌性口角炎、念珠菌性唇炎、慢性黏膜皮肤念珠菌病,念珠菌性口炎又分为急性假膜型、急性红斑型、慢性肥厚型、慢性红斑型、艾滋病相关性口腔念珠菌病。菌群失调引起的口腔念珠菌病多表现为急性假膜型和急性红斑型。急性假膜型是最常见的白假丝酵母病表现形式,常伴发于恶性肿瘤患者化疗后。急性红斑型又称抗生素口炎,与长期应用抗生素及激素有关。

2. 球菌性口炎　感染金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、肺炎链球菌所引起。临床以形成假膜损害为特征,又称膜性口炎。常常是几种球菌同时治病,引起口腔黏膜的急性损害。

口腔溃疡与单纯性疱疹病毒(HSV)有关,是由于机体内潜伏的病毒被激活所致,血清单纯疱疹病毒抗体呈阳性是白血病患者口腔溃疡的高发因素,而口腔单纯疱疹病毒常合并γ-溶血链球菌的感染。

3. 放射性口炎　临床常见于头颈部肿瘤接受放射治疗的患者。放射线高能辐射机体,引起组织细胞和器官的一系列反应和损害,破坏细胞正常代谢,引起口腔黏膜上皮基底和基底上层快速分裂的干细胞坏死,导致黏膜上皮正常组织更新、细胞分布、上皮完整性障碍,是口腔黏膜上皮萎缩、变薄和溃疡,细菌等微生物定植于放疗所致的损害面可放大炎症反应而进一步增加组织损伤。

二、免疫功能异常与口腔黏膜病

作为人体的生理屏障,口腔黏膜微生态中的免疫系统进化出特有的调节、抗炎机制,一方面耐受共生微生物以及食物、空气中的抗原,同时提供局部防御机制来应对入侵病原菌。这种精确的调节机制主要包括强大的固有免疫机制、类型独特的淋巴细胞及其产物,通过内皮细胞运输、分泌的聚合免疫球蛋白(SIgA)及起源于黏膜外分泌腺细胞的迁移和归巢。其中以黏膜微生态中的细胞、补体、抗体以及细胞因子为主参与发病机制,其与黏膜各类疾病的关系详述如下:

(一) 免疫微生态与免疫相关疾病

1. 免疫细胞　口腔黏膜免疫相关疾病的发生与微生态中各种免疫细胞的功能密切相关。现已达成共识,扁平苔藓是一种T细胞介导的免疫反应异常,始发于朗格汉斯细胞的激活,激活后的朗格汉斯细胞呈递抗原给$CD4^+$ T淋巴细胞,接着激活$CD8^+$ T细胞,激活的$CD8^+$ T淋巴细胞促使慢性炎症的发生并导致上皮的破坏。

口腔黏膜自身免疫性大疱性疾病的发生,由于致病性自身抗体产生并与自身抗原结合,固定并激活补体系统,引起肥大细胞脱颗粒,趋化中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等炎细胞在局部浸润并释放多种蛋白水解酶和炎症介质,所引发的免疫炎症反应导致在真表皮黏附中的分子结构和功能受损,最终发生表皮下或表皮内水疱。肥大细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞在大疱性疾病中起到了重要作用。

自身免疫性疾病白塞病患者中一类特殊的T细胞γδ T细胞增加,该细胞是介于特异性免疫与非特异性免疫之间的一种特殊类型的免疫细胞,大多数为CD4和CD8分子双阴性,少数可表达CD8,主要分布于黏膜和上皮组织中,在黏膜免疫过程中可能起重要作用。其表面抗原受体缺乏多样性,可直接识别热休克蛋白、受感染细胞表面的脂蛋白、某些病毒蛋白和分枝杆菌产生的小磷酸化非肽分子。可识别、杀伤某些病毒和胞内寄生菌(如李斯特菌)感染的靶细胞。提示γδT细胞可能在BD发病中起一定作用。Yamashita认为BD的恶化与

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

αβT 细胞与 γδT 细胞的异常调节均有关，中性粒细胞和内皮细胞相互作用是引起白塞患者血管炎的直接原因。

2. 补体与抗体　参与口腔黏膜微生物防御的抗体类型主要是 IgA、IgG 和 IgM，它们在疾病发生发展中主要起保护作用，但在免疫失调的患者中，抗体又促进了疾病的进展。以白塞病为例，体液免疫研究发现，白塞患者体内抗内皮细胞抗体（AECA）、抗磷脂抗体、抗淋巴细胞抗体增加，尤其是 IgA 表型 B 增加，虽然 B 细胞总数正常，但具有活性标记的 $CD13^+$、$CD33^+$、$CD80^+$ 及记忆型的 $CD45^+RO$ 细胞增加，产生自身抗体的 $CD5^+$、$CD19^+$ 细胞水平较低，这是白塞病不同于其他以自身抗体介导的自身免疫病的特征。

补体在口腔黏膜多种疾病中发挥了重要的作用，主要表现在自身免疫性疾病上。以大疱性疾病为例，补体 C3d 在天疱疮发生的经典途径和替代途径中发挥着重要作用。经典补体途径的激活导致 C3b 与补体片段的其他成分相互作用，导致了膜攻击复合物的形成，靶细胞的溶解及补体片段最终产物的形成，导致黏膜破坏。

3. 细胞因子　关于口腔黏膜微生态中细胞因子与黏膜疾病的研究多集中于免疫相关疾病如扁平苔藓、溃疡类疾病与大疱性疾病。扁平苔藓（OLP）病损和外周血中存在的细胞因子主要是 Th1 型细胞因子和 Th2 型细胞因子两大类。Th1 型细胞因子主要包括干扰素-γ（IFN-γ）、TNF；Th2 型细胞因子主要包括白细胞介素 IL-4、IL-6 和 IL-10。

IFN-γ 是最典型的 Th1 型细胞因子，其主要作用是通过上调主要组织相容性复合体（MHC）Ⅱ类分子及黏附分子的表达，促进细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocytes，CTL）的活化，活化的 CTL 可产生大量 IFN-γ，形成连锁反应。IL-18 在调节 IFN-γ 的产生过程中起着重要作用。同时，还通过 Fas 途径来增强 T 细胞和自然杀伤细胞的毒性。IL-4 是最主要的 Th2 型细胞因子。研究发现 IL-4 在 OLP 病损处局部表达缺乏。

IL-4 可抑制 Th1 细胞形成，阻断 IFN-γ 产生，削弱 CTL 的细胞毒效应，这与 OLP 病损中 IL-4 缺乏所导致的结果是一致的。IL-6 在 OLP 中发挥多重功能，一方面促进角质形成细胞的增殖，上皮增生，放大基底细胞的程序性细胞死亡过程；另一方面可能与 T 细胞浸润和 B 细胞增殖有关。OLP 患者血清 IL-10 升高，IL-10 促进体液免疫，抑制细胞免疫，提示 OLP 存在细胞免疫的缺陷。

扁平苔藓病损中趋化因子 ICAM-1 和 LFA-1 导致病损上皮的破坏，ICAM-1 与 VCAM-1 激活 $CD8^+T$ 淋巴细胞促使慢性炎症的发生。扁平苔藓累及的部位也和免疫反应中的细胞趋化因子密切相关，病损若只累及黏膜通常伴随 IFN-γ 的高表达，病损累及黏膜与皮肤则伴有 TNF-α 高表达。被 IL-1 激活的趋化因子 MCP-1、MIG、L-10、IL-8、MCP-1、GROγ 也在疾病的发展起到了重要的作用。

天疱疮患者疱液和血清中 IL-1、IL-2、IL-6 水平均高于正常对照组，与疾病严重性相关。一种由脂肪组织分泌的肽类激素——瘦素（leptin，LP）与天疱疮的发生相关，人们之前普遍认为它仅参与糖、脂肪及能量代谢的调节，增加能量释放，抑制脂肪细胞的合成，进而使体重减轻。现研究显示其可能通过与细胞因子的相互作用，参与了疾病的发生。

肿瘤坏死因子家族 B 细胞激活因子[B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor（TNF）family，BAFF]亦可能引起自身抗原驱动性自身反应性 B 细胞的活化，从而介导天疱疮的发病。对天疱疮患者外周血标本的检测显示，早期病程中，外周血中 BAFF 水平升高，治疗后其水平下降。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

与 Th-1 相关的趋化因子 CXCL9、CXCL10 和 CXCL11 以及其受体 CXCR3 在侵犯皮肤的慢性盘状红斑狼疮发展中起到重要的作用。研究显示这些趋化因子及其受体导致 Th1/Th2 的平衡打破，发生免疫紊乱从而导致病损的进展。白塞患者的皮损区真皮中浸润的 CIM+T 细胞和角质形成细胞显著表达 IL-16，患者体内许多细胞因子如 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IFN-γ 均较健康对照组多，IFN-γ/IL-4、IL-12/IL-4 的比例在活动期白塞病患者较缓解期增加，可作为活动期及伴有组织损伤白塞病的标记物。口腔黏膜下纤维化疾病的进展与炎症因子、生长因子分泌物的增加以及纤维化因子的减少也密切相关，但未见相应的机制报道。

（二）免疫微生态与口腔黏膜感染性疾病

单纯疱疹性口炎患者细胞免疫指标和 IgA 均有改变，提示其淋巴细胞系统受到损伤，免疫功能存在紊乱。个体的免疫状态决定了单纯疱疹性口炎病程的长短，其中关系最密切的是 IgA。IgA 愈低病程愈长，并发症愈多。IgA 的多少直接影响到分泌型(SIgA)，后者是口腔黏膜局部中和病毒的主要抗体，其降低使黏膜感染且迁延不愈，对患者免疫球蛋白的测定对本病的诊断、治疗及预后判断均有重要意义。

除微生态中菌群失调因素外，口腔黏膜的假丝酵母菌感染同样诱发了局部的炎症反应，并激活了细胞免疫。IL-12 与 $CD4^+$细胞相互关系可能是宿主清除口腔假丝酵母菌感染的重要机制之一，进一步实验证实了 $CD4^+T$ 细胞在口腔假丝酵母菌感染中的重要地位，其在宿主清除口腔假丝酵母菌感染中起重要作用。

第三节　口腔黏膜病相关的微生物

一、与口腔黏膜病相关的病毒

（一）单纯疱疹病毒

单纯疱疹病毒(herpes simplex virus，HSV)是疱疹病毒的典型代表，可引起皮肤或黏膜的水疱性损害，是人类极其常见的一种病毒。90% 的 50 岁以下人群血清中有抗 HSV1 抗体，说明已感染或正感染此种病毒。单纯疱疹病毒易侵袭来源于外胚叶的组织，如神经系统、皮肤及黏膜等。

一般而言，HSV-1 主要引起腰以上的皮肤黏膜的病损，包括口腔黏膜、口周皮肤和面部；而 HSV-2 主要累及腰以下的皮肤黏膜及生殖器的感染。但随着人们生活方式，特别是性生活方式的改变，这种分界逐渐变得模糊。越来越多的调查显示，在口腔单纯疱疹病损中，甚至是健康人的口腔中分离到了 HSV-2 病毒。

一些病毒特异性的酶(如胸腺核苷酸激酶)在 HSV-1 与 HSV-2 中具有型特异性。存在上述差异的根本原因在于控制这些表现型的基因结构和功能的不同。

人群中 HSV 感染非常普遍，患者及无症状带毒者为传染源。口腔单纯疱疹病毒的传染主要是通过飞沫或接触了含 HSV 的唾液、患者的疱疹液所致，胎儿还可经产道感染。

在接触 HSV 的早期，HSV 可以随机靠静电吸引力非特异地吸附于细胞膜表面，与宿主易感细胞(如口腔黏膜上皮细胞)细胞膜上的相应受体发生不可逆的特异性结合。

一般情况下，HSV 的包膜与宿主易感细胞的细胞膜融合，病毒衣壳和核心进入宿主细胞

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的细胞质；但有时完整的病毒体也可以通过胞饮作用进入细胞内。

在宿主细胞质中，HSV 衣壳与病毒核心分离。HSV 核心 DNA 通过核膜进入宿主细胞核，并开始进行生物合成。HSV 的核心 DNA 利用宿主细胞核中核酸合成系统相关的酶和单核苷酸，按照 HSV 的遗传信息进行大量地复制，同时在宿主 RNA 聚合酶作用下，进行 HSV 衣壳蛋白的 mRNA 转录。转录后形成的 mRNA 穿过细胞核进入细胞质，在核糖体上翻译并形成 HSV 的衣壳蛋白微粒。这些新形成的蛋白微粒转移到细胞核内。

复制出的大量病毒 DNA，在核内与新形成的大量衣壳蛋白微粒结合，通过核膜时获得表层包膜，即成为成熟的病毒颗粒。成熟的病毒颗粒通过细胞的内质网系统向胞外溢出。

大量的病毒颗粒引起核仁肿胀破碎，造成宿主细胞的急剧破坏，从而形成临床急性发作性病损——疱疹性龈口炎（herpetic gingivostomatitis）。

口腔 HSV 感染后，HSV 潜伏部位主要是三叉神经节及颈上神经节。当 HSV 在口腔黏膜造成原发性感染后，病毒向上进入三叉神经上颌支及下颌支的感觉神经，并沿神经节鞘逆行至三叉神经的神经节细胞或周围的星形神经胶质细胞内潜伏。病毒在体内免疫力压制下维持复制周期，不破坏神经细胞，进入潜伏期。在潜伏期，DNA 复制与一些基因产物相关，如 VP16、ICP4、ICP0、潜伏相关转录产物（latency-associated transcripts，LATs）。具体机制不清，可能受 DNA 甲基化调控。LATs 基因产物阻止三叉神经节中神经元的程序化细胞死亡，并保护潜伏期中 HSV1 的蓄积。

一些全身因素（如激素变化、情绪波动、劳累、感冒）或黏膜局部受到外伤、过度日照等刺激将造成 HSV 感染的复发。潜伏病毒被激活后出现增殖，并沿着神经纤维轴索向下移行至感觉神经末梢，散布于该处上皮细胞内。病毒在该部位继续增殖并造成该部位的损害，引起局部的复发性疱疹，即临床上常见的复发性唇疱疹（recurrent herpes labialis，RHL）。

关于 HSV 潜伏与复发的机制，传统观点认为主要与机体建立的抗 HSV 的细胞与体液免疫因素有关。新近的分子生物学研究揭示，HSV 潜伏还与 HSV DNA 甲基化及潜伏相关转录有密切关系（图 13-3）。DNA 甲基化是指在 DNA 的胞嘧啶上形成甲基，导致该段基因特性的变异。在 HSV 潜伏感染的细胞中，HSV 的 DNA 胞嘧啶是高度甲基化的，而在诱导病毒活化并导致细胞感染时，这种甲基化则丢失。这可能是由于 DNA 的甲基化常伴随有基因表达的关闭，而去甲基化则可使这些关闭的基因重新活化。潜伏相关转录是指 HSV 在潜伏过程中并非是静止不代谢的，它们也可能进行 HSV 某段片段的转录，形成一些特殊蛋白质。由于这些蛋白质之间的相互作用以及这些蛋白质与宿主细胞的相互作用，从而维系了潜伏状态。若这些相关转录被破坏，则病毒可能活化，并造成病变的发生。

在感染的 HSV 数量较少、机体抵抗力较强或长期潜伏的情况下，HSV 的全部或部分 DNA 可以与宿主细胞核基因组结合并共同复制，导致细胞的转化。转化细胞的主要变化是生长、分裂失控，在体外培养时失去单层细胞相互间的接触抑制，形成细胞间的重叠性生长，细胞表面出现新抗原等。据报道，在口腔白斑病组织和口腔鳞癌组织中均检测到 HSV 存在，从而支持了 HSV 可能是口腔癌前病变和鳞癌发生的重要诱因的推论。

（二）水痘-带状疱疹病毒

水痘-带状疱疹病毒（Varicella-Zoster virus，VZV）是另一类可引起面部感染的常见的疱疹病毒，其基本特性与 HSV 相似。此病毒只有一个血清型，在儿童初次感染时引起水痘；而潜伏多年后在成人中复发则表现为带状疱疹，常伴有明显的神经痛，故称为水痘-带状疱疹

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

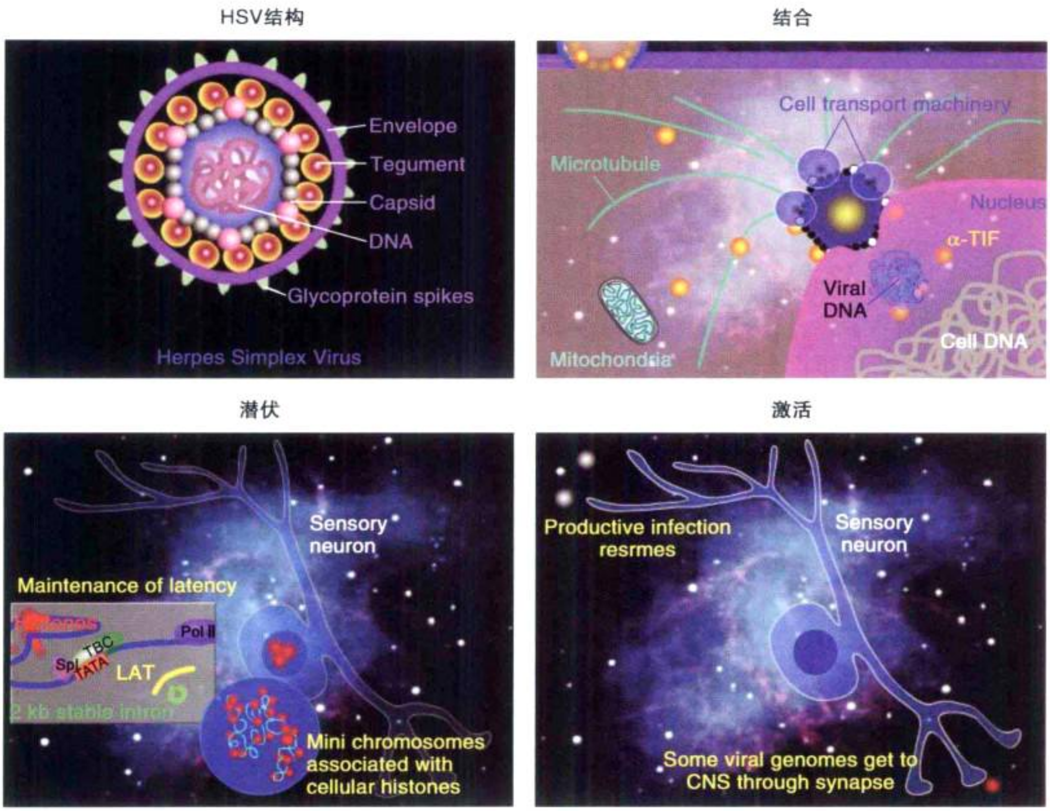


图 13-3　HSV-1 原发感染起始于结合受体细胞并释放其 DNA 于胞内。潜伏及激活过程发生在感觉神经节，主要在三叉神经节中

注：该图片来自：the web site：http://www.dbc.uci.edu/ ~ faculty/wagner/movieindex.html

病毒。

人是水痘-带状疱疹病毒唯一的自然宿主，皮肤是病毒的主要靶细胞。VZV 所致的原发感染称为水痘（varicella）。VZV 由呼吸道侵入机体内，无免疫力的儿童初次感染后病毒在局部淋巴结增殖，然后侵入血液并扩散至全身，约经 2 周潜伏期后患儿全身皮肤出现斑疹、丘疹、水疱甚至脓疱。皮疹分布呈向心性，躯干比面部和四肢多。皮疹内有大量的病毒，在感染的棘细胞内出现核内嗜酸性包涵体，也可形成多核巨细胞。水痘的病情一般较轻，偶尔并发病毒性脑炎或肺炎。但存在细胞免疫缺陷、白血病或正在接受皮质激素、细胞毒药物治疗的患儿，常易发生重症水痘。

成人首次感染 VZV 者常发生病毒性肺炎，一般病情较重，病死率较高。孕妇患水痘可能引起胎儿畸形、流产或死产。原发性 VZV 感染会产生特异性抗体和 T 细胞介导的免疫应答。T 细胞介导的免疫应答细胞在皮疹出现后 1 ~ 2 周内出现，包括 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 效应 T 细胞和记忆 T 细胞。这种保护性免疫应答可使患者获得持久的免疫力。VZV 可随神经进入脊神经背根神经节或脑神经的神经元中长期潜伏而不引起症状，形成潜伏感染。若体内的高效价抗体不能清除潜伏在神经节中的病毒，以后可发生带状疱疹。

带状疱疹（herpes zoster）多发生于有水痘病史的成人。某些诱发因素，如年龄（40 岁之

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

后）、接受放射治疗、器官和骨髓移植、患白血病或淋巴瘤时、免疫抑制疾病或治疗等，可减弱T细胞介导的免疫反应。潜伏在神经节细胞中的病毒基因组被激活，沿感觉神经轴索到达所支配的胸、腹或脸部皮肤细胞内增殖，引起复发。在相应神经节分布部位皮肤上形成水疱，串联成带状，发生于单侧而不越过中线。皮肤疱疹能合为大疱，后成痂壳，逐渐吸收并消退。口腔黏膜一般为仅限于单侧的大面积溃疡面。病程持续约2~4周。伴发症状包括乏力不适、头痛、畏光等。由于疱疹病毒侵及感觉神经分支，患者出现剧痛。VAV入侵膝状神经节可出现外耳道或鼓膜疱疹，同时侵犯面神经的运动和感觉神经纤维时，表现为面瘫、耳痛及外耳道疱疹三联症，称为Ramsay-Hunt综合征。

水痘和带状疱疹的临床症状都比较典型，一般可不依赖于实验室检查诊断。必要时可从疱疹基底部取材进行涂片染色检查嗜酸性核内包涵体，或用单克隆抗体免疫荧光染色检查VZV抗原，有助于快速诊断。

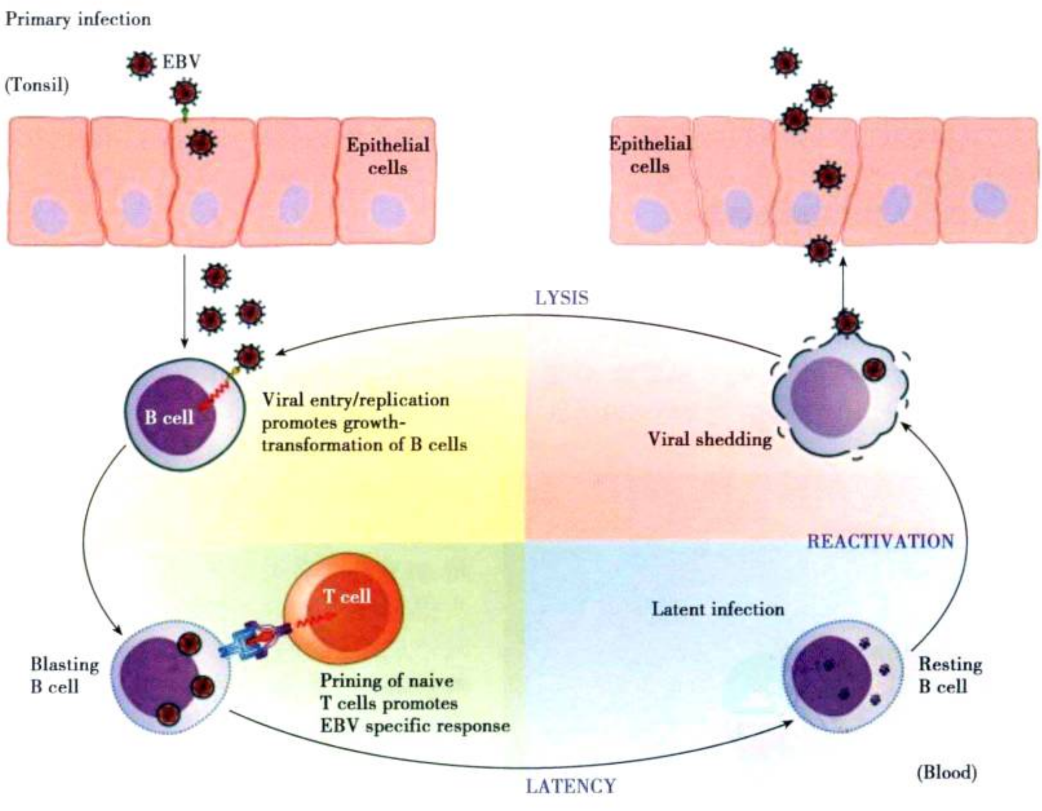


图13-4　EBV感染模式图

注：原发性EBV感染时，EBV利用不同的糖蛋白感染上皮细胞和B细胞，病毒入侵细胞后将其基因组转移至B细胞核，复制开始。EBV基因产物激活B细胞生长程序，通常，这些B细胞会被细胞毒性T细胞破坏。在体内循环过程中，如果EBV大部分蛋白编码基因停止表达，潜伏期开始。B细胞亦可被再激活，导致病毒播散。该图片来自：Odumade OA，Hogquist KA，Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. Clin Microbiol Rev，2011，24(1)：193-209

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（三）EB 病毒

1964 年，Epstein 和 Barr 在研究非洲儿童恶性淋巴瘤的病因时，从瘤细胞培养中发现一种新病毒，命名为 EB 病毒（Epstein-Barr virus，EBV）。电镜下其形态结构与疱疹病毒相似，但抗原性却不相同。

EBV 病毒体主要由衣壳蛋白包裹双链线性 DNA 组成，由于病毒核抗原的不同分为 2 个亚型。EB 病毒主要侵犯 B 细胞，病毒 gp350 蛋白与 B 淋巴细胞上的 CD21 识别结合，通过胞吞作用进入细胞质。大多数病毒 DNA 都是以环形分子形式游离于细胞染色体外，只有少数病毒 DNA 与细胞 DNA 整合，通过 DNA 聚合酶进行复制。过去认为，只有 B 细胞表面有 EBV 受体。最近发现在腮腺管、咽部以及宫颈外的某些上皮细胞亦有 EBV 受体。因此，EBV 亦可感染上皮细胞（图 13-4）。还有少许 T 细胞。

与 EBV 感染有关的疾病主要有 3 种：传染性单核细胞增多症、非洲儿童恶性淋巴瘤和鼻咽癌。EBV 感染引起的口腔黏膜疾病主要有口腔黏膜毛状白斑，这种疾病发生于人类免疫缺陷病毒感染等免疫功能低下的患者，表现为口腔黏膜局部的白色云雾状斑块，不能擦去，表面呈绒毛样，光学显微镜下具有气球样变等病毒感染的特征。采用免疫组织化学方法或基因诊断方法，可查出病损组织中存在 EB 病毒抗原或 EB 病毒 DNA。EB 病毒感染导致口腔黏膜毛状白斑的机制主要是通过影响口腔黏膜局部的免疫屏障（如朗格汉斯细胞的功能）造成的。

（四）人类免疫缺陷病毒

人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）属于反转录病毒科的慢病毒亚科，是获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome，AIDS）即艾滋病的病原体。艾滋病的传染源是人类免疫缺陷病毒无症状携带者和艾滋病患者（图 13-5）。从血液、精液、阴道分泌物、乳汁、唾液、脑脊液、骨髓、皮肤及中枢神经组织等标本中，均可分离到病毒。迄今为止，HIV 感染在世界范围内仍是一个重大的医疗难题。

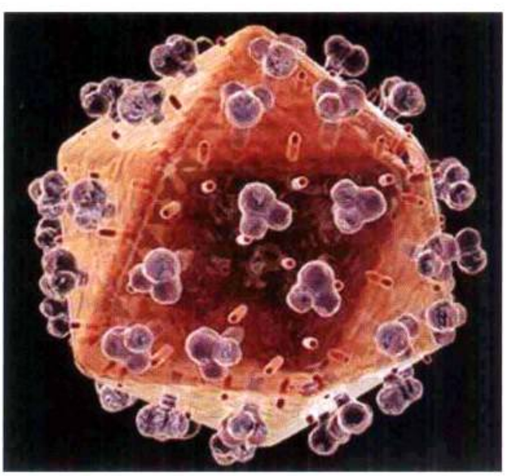


图 13-5　HIV-1 三维结构示意图

注：该图片来自：http://www.3dscience.com/3D_Models/Biology/Viral/HIV.php

艾滋病传播主要有 3 种方式：①通过同性或异性间的性行为；②输入带 HIV 的血液或血制品、器官或骨髓移植、人工受精、静脉药瘾者共用污染的注射器及针头；③母婴传播，包括经胎盘、产道或经哺乳等方式引起的传播。艾滋病的高危人群是同性恋者、静脉药瘾者、血友病患者及其他接受输血者。迄今尚未发现通过飞沫、握手以及共用候诊室等传播的报道。只要注意防护，艾滋病是可以预防的。

HIV 侵入人体后，选择性地侵犯表面表达 $CD4^+$ 抗原的细胞，主要有 TH 淋巴细胞、单核-巨噬细胞、树突状细胞等。HIV 通过其表面蛋白与细胞表面 CD4 分子相互作用，最终融合造成细胞的破坏。$CD4^+$

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

细胞在免疫应答中起关键作用，随着其数目的不断减少，患者的免疫功能不断下降，易发生严重的机会感染和恶性肿瘤，最终导致死亡。

HIV 初次感染人体后即开始一个大量复制和扩散的过程，感染者血清中出现 HIV 抗原，从外周血细胞、脑脊液和骨髓细胞中亦能分离到病毒，即为 HIV 原发感染的急性期。感染者可出现发热、咽炎、淋巴结肿大、皮肤斑丘疹和黏膜溃疡等自限性症状。持续 1～2 周后进入 HIV 感染的无症状潜伏期，此时外周血中的 HIV 抗原含量很低或检测不到。随着感染时间的延长，HIV 重新开始大量复制并造成免疫系统的进行性损伤，逐步发展到持续性全身性淋巴结肿大、艾滋病相关综合征，最后发展为艾滋病。

口腔表现一般是 HIV 感染的最早和最重要的指示者。与 HIV 感染密切相关的口腔病损主要包括 7 种：口腔念珠菌病，毛状白斑，卡波西肉瘤，牙龈线形红斑，坏死溃疡型牙龈炎，坏死溃疡型牙周炎，非霍奇金淋巴瘤。此外，还包括一些不典型溃疡、涎腺疾病、病毒感染（巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、乳头瘤病毒、带状疱疹病毒）等表现。大多数病损与 $CD4^{+}$T 细胞计数<200/μl，血浆病毒负载>3000copies/ml 有关。熟悉 HIV 口腔表现对于早期诊断和治疗，防止感染进一步播散有重要意义。

口腔念珠菌病在 HIV 感染人群中发生率很高，其中尤以假膜型口腔念珠菌病最为常见。念珠菌感染在 HIV 成人中感染率 1.5%～56%，假膜型念珠菌病占 55.8%～69.7%，其次是红斑型 25.7%～50%，口角炎 13.7%～27.1%。口腔念珠菌病的感染频率常与 $CD4^{+}$ T 细胞计数下降、病毒量增多有关。

（五）人乳头瘤病毒

乳头瘤病毒（human papilloma virus，HPV）属于乳多空病毒科的乳头瘤病毒属，为 DNA 病毒，包括多种动物乳头瘤病毒和人乳头瘤病毒。由于 HPV 与人类的许多新生物的形成具有较密切的关系，相关研究成为近年来临床病毒学的研究热点。

乳头瘤病毒具有宿主和组织特异性，只能感染人的皮肤和黏膜上皮细胞。目前，乳头瘤病毒尚未能在组织细胞中培养，影响了对病毒复制特性的研究。在人皮肤疣的上皮不同细胞层进行原位分子杂交发现，乳头瘤病毒的复制周期受细胞分化状态所限制。在疣的基底层细胞内，乳头瘤病毒 DNA 呈静息状态。随着基底层细胞向表层移动，DNA 开始在棘细胞内复制并表达早期基因。而病毒晚期基因的表达和结构蛋白的合成，则在粒细胞层的胞核内进行。这种 DNA 复制、衣壳蛋白合成和装配只能在上皮不同细胞层内进行的特点，有助于了解 HPV 感染、致病和转化作用的机制（图 13-6）。

乳头瘤病毒的传播主要通过直接接触感染者的病损部位或间接接触被病毒污染的物品，生殖器感染主要由性交传播，新生儿可在通过产道时受感染。病毒仅停留于局部皮肤和黏膜中，不产生病毒血症。

HPV 疾病谱广泛，累及皮肤和黏膜，包括肛门、生殖器、尿道、皮肤、喉、气管支气管黏膜、鼻腔、口腔。口腔 HPV 感染与很多口腔疾病相关，具体传播方式仍然不清。HPV 会形成隐性的亚临床感染，可能于早期获得，即起源于出生时母亲的产道感染。但认为水平传播是其主要途径，通过密切接触，如性接触（口交）、非性传播（与患者共用湿毛巾等）和自身接种。口腔 HPV 感染会导致不同的临床表现，低危型 HPV 基因型常引起良性口腔黏膜病损，如寻常疣、尖锐湿疣、局灶性上皮增生、口腔乳头瘤，最常见的低危型是 HPV6 和 HPV11。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

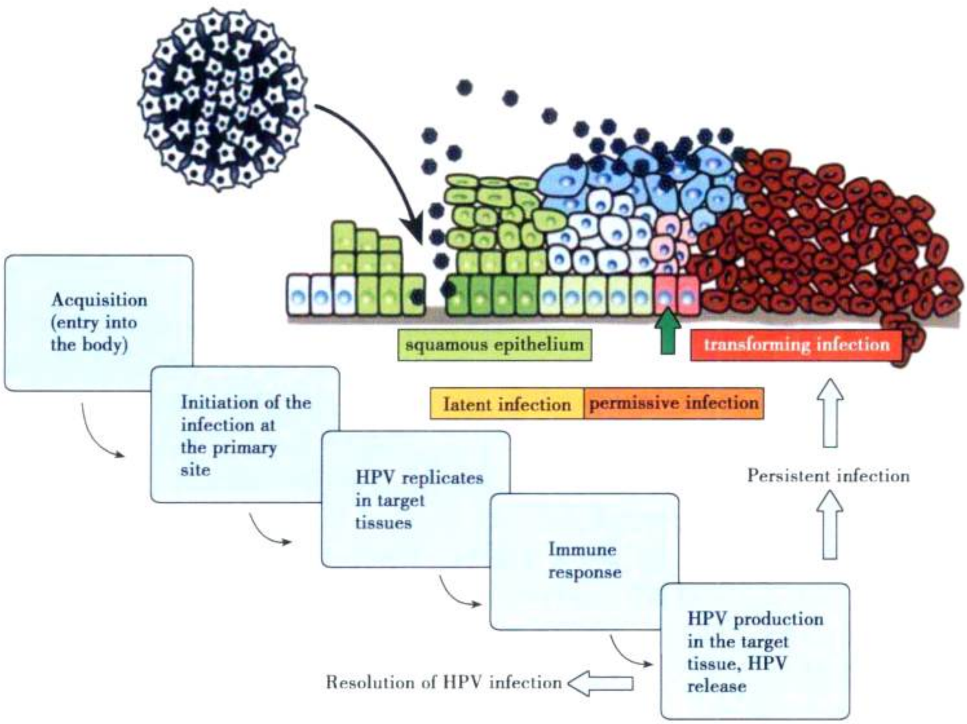


图 13-6 HPV 感染阶段示意图

注：该图片摘自：Rautava J，Syrjanen S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. J Am Dent Assoc，2011，142(8)：905-914

（六）柯萨奇病毒

柯萨奇病毒（Coxsackievirus）为肠道病毒，属于小 RNA 病毒科肠道病毒属。柯萨奇病毒直径 20～30nm、20 面体对称、无包膜，基因组为单链正 RNA，RNA 具有感染性并可直接起 mRNA 作用（图 13-7）。

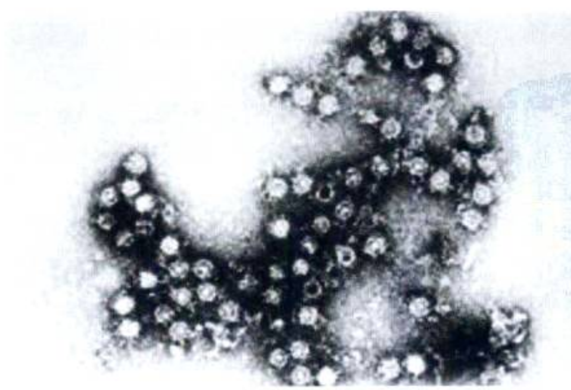


图 13-7 柯萨奇病毒免疫电镜示意图

注：该图片来自：http://en.wikipedia.org/wiki/Coxsackievirus

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

柯萨奇病毒对新生小鼠的致病特征不同,据此可将其分为A组和B组。然后又进一步根据其交叉中和试验将A组再分为24个血清型,B组分为6个血清型。

柯萨奇病毒经消化道感染,血行播散,最终侵犯多种组织、器官,主要引起两种口腔黏膜疾病。一种为手-足-口病,由柯萨奇病毒A16、A5、A10引起,多在集体场所暴发流行,在我国流行地区分离出的病毒主要为A16;另一种为疱疹性咽峡炎,由柯萨奇病毒A4引起。这两种口腔疾病均有水疱形成。患者感染柯萨奇病毒后可获得长期而牢固的型特异性免疫,主要以体液中和抗体为主。局部sIgA对病毒感染具有重要的防御作用。

(七)肠道病毒71型

肠道病毒71型(human enterovirus 71,EV71)是引起婴幼儿手足口病(hand-foot-mouth disease,HFMD)主要病原体之一。为人肠病毒A群中的一型,属单链RNA病毒,包括约7500个碱基对。病毒基因组包括5'和3'非翻译区,对病毒表达和复制起关键作用。基因组编码4种衣壳蛋白(VP1~VP4)和7种非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D)。EV71低保真复制和频繁重组等特征造成其高突变率。EV71常与世界范围内手足口病大面积暴发相关,并可能引起严重并发症,如脑膜炎和心肌炎。在泰国发现,暴发感染的病毒中5'非翻译区(5'-untranslated region,5'-UTR)的内部核糖体进入位点原件[internal ribosome entry site (IRES) element]中多数核苷酸发生突变,说明肠道病毒的暴发具有其分子基础。

EV71主要引起手足口病,还可引起无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样的麻痹等多种神经系统疾病。手足口病和中枢神经系统感染是EV71感染而引起的两大常见临床症状。手足口病是婴幼儿中常见的病毒感染性疾病。主要临床特点为口腔和肢体远端水疱或破溃后形成溃疡,10岁以下儿童多发。发病率以夏季和初秋为高。通常由柯萨奇A型(A16)病毒或肠道病毒71型引起。国内研究表明,HFMD发病率逐年增高,A16和肠道病毒71型均为主要致病菌,且患儿年龄越小,危重程度和致死率越高。HFMD传染源为患者或病毒携带者,一般通过直接接触和飞沫传播。需要提醒注意的是,此病与动物口蹄疫无关。

二、与口腔黏膜病相关的假丝酵母菌

假丝酵母菌又称念珠菌(Candida),属真菌界、半知菌亚门、隐球酵母菌科。假丝酵母菌是正常人口腔、胃肠道、呼吸道及阴道黏膜的常见共生菌,仅能在特定的条件下造成对宿主的感染,属条件性致病菌。

在假丝酵母菌属中,有部分念珠菌对人类具有致病作用。其中,白假丝酵母菌(*Candida albicans*)引起的感染最为常见,其毒力也最强。其他如热带假丝酵母菌(*Candida tropicalis*)、光滑假丝酵母菌(*Candida glabrata*)、近平滑假丝酵母菌(*Candida parapsilosis*)、克柔假丝酵母菌(*Candida krusei*)、吉利蒙假丝酵母菌(*Candida guillermondii*)、都柏林假丝酵母菌(*Candida dulbilin*)等也可致病。与白假丝酵母菌相

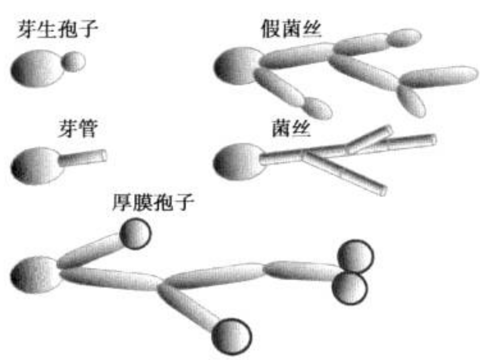


图13-8　白假丝酵母菌生长形态模式图

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

比，这些假丝酵母菌引起的感染较为少见。近年来，都柏林假丝酵母菌在健康成人以及 HIV 阳性患者口腔中的检出率呈逐渐上升趋势。

（一）假丝酵母菌致病性

在大部分感染性疾病的发病机制中，微生物的致病力是关键因素。口腔念珠菌性损害的发生，不仅与微生物因素有关，还与宿主因素密切相关，后者对损害的易感性起决定性作用。此外，医源性因素在口腔黏膜念珠菌损害发生中的作用，也逐渐引起研究者和临床工作者的重视。

1. 假丝酵母菌毒力因素　假丝酵母菌致病机制虽至今尚未完全明了，但目前的研究表明，与某些细菌产生致病性毒素而致病的机制不同，假丝酵母菌没有单独的某种明显引发念珠菌性损害的致病因子，它的多种生物学特征与其致病性有关。

（1）黏附力：假丝酵母菌定植和感染的首要步骤是念珠菌对宿主黏膜表面的黏附。黏附由假丝酵母菌表面的黏附素（adhesin）及宿主细胞表面的特异性受体介导。白假丝酵母菌黏附素，多为糖蛋白，与宿主细胞表面受体可通过蛋白-蛋白或蛋白-碳水化合物相互作用的方式连接。

（2）疏水性：疏水性是细胞壁的固有特性，是一种与假丝酵母菌对宿主表面黏附相关的物理性力。疏水性通过促进假丝酵母菌之间的黏附而对黏附力发挥间接影响，并因此促使假丝酵母菌致病。

（3）二相性：白假丝酵母菌通常被归纳为一种二相性真菌（dimorphic fungus），即芽生孢子相和菌丝相，但实际上，白假丝酵母菌在不同的生存环境下还可表现为假菌丝和厚膜孢子相。

一般认为，菌丝相的白假丝酵母菌毒力最强，对组织的侵袭性最高，假菌丝相次之。孢子相可能更有利于白假丝酵母菌在血液中的传播。芽管（germ tube）的形成标志着菌丝生长的开始，与假丝酵母菌损害的发病机制尤其相关。这些圆柱状突起的芽管使假丝酵母菌对上皮细胞的黏附更为便利，并使之具备对吞噬细胞杀伤的抵抗力。芽管还促进假丝酵母菌细胞聚集，并在邻近的菌丝之间充当连接体，将许多假丝酵母菌连接起来，并使之与上皮细胞紧密接触。

二相性是白假丝酵母菌的一个重要特征，也是白假丝酵母菌较其他种类的念珠菌毒力更强的主要原因。

（4）转化现象：白假丝酵母菌通常表现出可变的菌落形态，即将能形成光滑型菌落的菌株接种到一些特殊的琼脂培养基上，产生一部分具有粗糙表面的菌落，这是光滑型菌落向粗糙型菌落的转化。白假丝酵母菌还表现出另一种转化现象，白色-不透明转化现象，即白色光滑的菌落转化为平伏灰色的菌落，这种平伏灰色菌落由于在光照条件下折射光线而被以往的研究者形容为“不透明”转化现象。

白假丝酵母菌转化在其致病中具有一定作用，其致病特性可能由于发生转化而有所加强。

（5）水解酶：白假丝酵母菌可分泌水解酶，包括水解肽键的蛋白酶和水解磷脂酯键的磷脂酶。这些酶可直接引起组织破坏，利于菌体穿透组织。蛋白酶还可破坏免疫球蛋白，帮助白假丝酵母菌逃避宿主的内在免疫和获得免疫。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

蛋白酶的代表为分泌型天门冬氨酸蛋白酶(secreted aspartic proteinases,SAPs)。SAPs属于酸性蛋白酶,目前已知的有至少10种,在白假丝酵母菌感染的各阶段均有分泌,被认为与营养获取、黏附、组织穿透、免疫逃逸、细胞损伤、凝血级联以及血管通透性的增加有关。

磷脂酶是一组具有水解1个或多个甘油磷脂酯键能力的酶的总称。尽管所有磷脂酶都将磷脂作为底物,每种酶只具有切断一种特异酯键的功能。通常,根据磷脂酶作用的特异性酯键的不同,将其归为磷脂酶A、B、C和D4类。在所有磷脂酶中,磷脂酶B(PLB)与90%的念珠菌磷脂酶细胞外活性有关。

磷脂酶与白假丝酵母菌毒力的相关性,近年来逐渐受到有关学者们的注目。已经证实,磷脂酶在微生物宿主细胞的穿入、损伤和溶解中发挥着作用,因此,磷脂酶被纳入破坏宿主细胞的毒力因子的范畴内。

在磷脂酶和蛋白酶的产生、黏附、芽管生成、生长频率及对内皮细胞的破坏能力等毒力因子中,只有细胞外磷脂酶活性可预测死亡率。磷脂酶B并非直接影响白假丝酵母菌对宿主细胞的黏附,而是通过直接破坏宿主细胞膜来提高白假丝酵母菌毒力。磷脂酶是一种强力炎症递质,诱导炎症细胞、浆细胞的聚集和多种体内炎症递质的释放。磷脂酶还能引发花生四烯酸和前列腺素的合成。这些都可能提高白假丝酵母菌毒力。

(6) 假丝酵母菌生物膜:近20年来,有关假丝酵母菌生物膜的研究逐渐增多,现认为形成生物膜的能力是假丝酵母菌重要毒力因子。

目前研究发现,白假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、都柏林假丝酵母菌均可形成生物膜,但白假丝酵母菌仍被认为是与人体内生物膜相关的感染关系最为密切的菌种。

白假丝酵母菌生物膜可抑制外周血单个核细胞分泌促炎细胞因子,抑制机体的防御性炎症反应。在白假丝酵母菌生物膜中加入上述细胞不仅没有抑制作用,反而会促进白假丝酵母菌生物膜的生长。

生物膜内假丝酵母菌对抗真菌药物的耐药性明显增强,可达浮游菌的几十至上千倍。其耐药性增强的机制尚不明确,目前研究发现可能与以下因素有关:①生物膜的细胞外基质形成阻止药物穿透的物理屏障;②耐药基因如多药物耐药基因(multidrug resistance genes)和假丝酵母菌耐药基因(Candida resistance genes)表达升高;③菌细胞表面三磷酸腺苷结合盒(ATP binding cassettes)和药物外排泵(drug efflux pump)相关蛋白表达升高,增加了药物的排出速度;④生物膜中假丝酵母菌发生表型改变,形成对药物耐受能力更强的持留细胞(persister cells);⑤细胞膜固醇组成改变,使药物穿透能力下降。

(7) 其他因素:包括假丝酵母菌产生的毒素和酸性代谢产物,假丝酵母菌吸混作用(persorption),假丝酵母菌对宿主吞噬系统、免疫系统和补体的干扰,假丝酵母菌与细菌的协同作用等方面。

2. 宿主因素　宿主易感因素分为局部因素和全身因素。局部易感因素包括:①黏膜屏障的破坏:含内源性和外源性上皮改变,黏膜屏障的破坏使念珠菌的入侵易于发生;②唾液质和量的改变:唾液pH降低和葡萄糖含量增高,唾液流量的减少或无唾液均可能导致念珠菌定植于口腔;③共生菌丛:口腔微生物丛的竞争性抑制是对假丝酵母菌定植和过度生长的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

重要限制因素，也可能与假丝酵母菌产生协同作用而引起口腔假丝酵母菌损害；④营养因素：食物中碳水化合物的含量增高，常促进假丝酵母菌损害的发生。

全身易感因素包括：①年龄：婴儿期机体免疫系统正处于发育阶段，老年期免疫系统防御功能下降、唾液分泌减少等，使得这两类人群更易遭受假丝酵母菌感染；②激素状况：如甲状腺功能减退、甲状旁腺功能减退、肾上腺功能不足等；③营养状况：如铁质缺乏症、叶酸缺乏和维生素缺乏症等；④免疫状况：如各种原因引起的免疫缺陷和免疫抑制等。

3. 医源性因素　促使假丝酵母菌感染发生的医源性因素涉及义齿不适、抗生素和肾上腺皮质激素类药物的局部长期或大剂量应用以及全身的广谱抗生素、肾上腺皮质激素、细胞毒药物和放射治疗及避孕药物的应用等方面。

（二）与假丝酵母菌感染有关的口腔黏膜损害

假丝酵母菌感染所造成的口腔黏膜损害临床表现复杂多样，难以进行准确的分类。目前，普遍接受的分类方式是将这些损害分为 2 个大的类别，即原发性和继发性损害。原发性口腔假丝酵母菌损害是指局限于口腔和口周组织假丝酵母菌感染；继发性口腔假丝酵母菌感染是指全身系统性假丝酵母菌感染的口腔表现。

（三）假丝酵母菌与口腔上皮癌变的关系

假丝酵母菌是口腔白斑发生与癌变的相关因素，其中白假丝酵母菌与口腔上皮癌变的相关研究最多。流行病学的资料表明，口腔白斑和口腔鳞癌病损表面分离出白假丝酵母菌的概率明显高于正常口腔黏膜，念珠菌性白斑异常增生程度和癌变率高于非念珠菌性白斑；约 10% 慢性增殖性念珠菌病可发生癌变。该病是一种自身免疫调节基因突变引起的常染色体退行性疾病，患者常常在幼年时即发生慢性口腔念珠菌感染，发生口腔鳞癌的概率较高，常在青年时期即发病。

动物实验发现，大鼠舌黏膜接种白假丝酵母菌可形成念珠菌性白斑；大鼠舌黏膜长期的念珠菌感染可引发上皮异常增生；在大鼠口腔黏膜癌变的诱导实验中，采用 4-硝基喹啉-1-氧化物（4NQO）进行初始诱导后，白假丝酵母菌可诱导大鼠口腔黏膜发生癌变，其作用效果与已知的促癌物质佛波酯类似。

假丝酵母菌促进口腔上皮癌变的机制尚不明确，可能包括以下几个方面：①直接产生致癌物质：假丝酵母菌可利用唾液中的前体物质，直接产生致癌物质如 N-亚硝基-苄基苯胺、乙醛等。②促进其他致癌物的作用：白假丝酵母菌促进经 4NQO 初始诱导的大鼠口腔黏膜癌变。③水解细胞外基质和基底膜：假丝酵母菌产生的水解酶可能在口腔角质形成细胞外基质的降解以及基底膜的破坏中发挥了一定的作用，为变异的口腔上皮细胞侵入基底层创造了条件。④诱发慢性炎症：假丝酵母菌可诱发口腔黏膜局部慢性炎症的形成。炎症介质，包括各种酶、补体蛋白、细胞因子等，在破坏入侵的病原微生物的同时，也可能促进细胞增殖、抑制细胞凋亡，从而促进上皮癌变。⑤对口腔角质形成细胞的直接作用。

白假丝酵母菌及其代谢产物作用于口腔角质形成细胞后，可激活口腔角质形成细胞 ERK/FAK 信号通路，促进口腔角质形成细胞迁移，同时降解口腔角质形成细胞表面的 E-钙黏素，引起细胞间连接的破坏。细胞迁移能力的增强和细胞间连接的破坏在口腔上皮癌变中具有重要意义，是肿瘤细胞脱离上皮层，向深部入侵的重要条件。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

三、与口腔黏膜病相关的细菌

引起口腔黏膜感染的细菌主要为革兰阳性球菌，包括金黄色葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌等，可以为单独感染或混合性感染。

（一）金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌（*S. aureus*）是人类最重要的化脓性细菌，毒力强。金黄色葡萄球菌在自然界中无处不在，感染多见于春夏季；中毒食品种类多，如奶、肉、蛋、鱼及其制品。金黄色葡萄球菌是人类化脓感染中最常见的病原菌，可引起局部化脓感染，也可引起肺炎、假膜性肠炎、心包炎等，甚至败血症、脓毒症等全身感染（图 13-9）。致病力强弱主要取决于其产生的毒素和侵袭性酶。

金黄色葡萄球菌毒力因子包括：①细胞毒素（α、β、γ、δ、杀白细胞素）、表皮剥脱毒素、肠毒素、毒性休克综合征毒素-1 等。②凝固酶、纤维蛋白溶酶、耐热核酸酶、透明质酸酶、脂酶等，凝固酶的作用是使周围血液或血浆中的纤维蛋白沉积于菌体表面，阻碍机体吞噬细胞的吞噬，即使被吞噬也不易被杀灭。同时，凝固酶聚集在细菌周围，亦能保护病菌不受血清中杀菌物质的破坏。③细菌的一些结构蛋白。④细菌胞壁成分，如黏附素、荚膜、胞壁肽聚糖等。

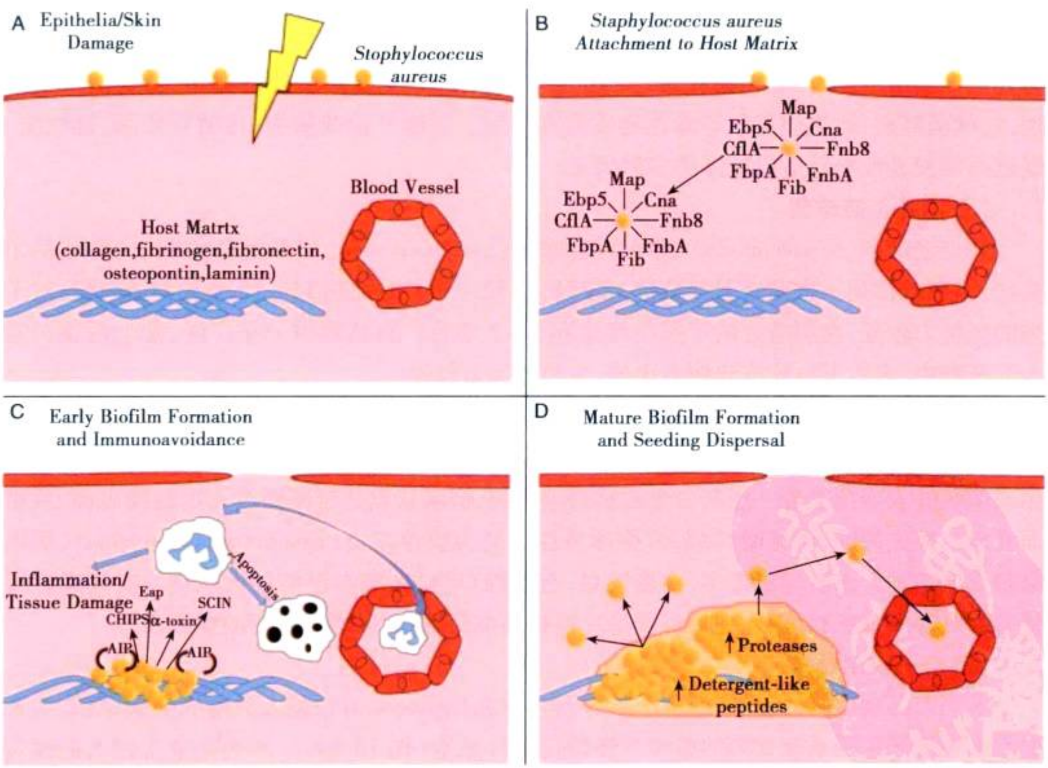


图 13-9 金黄色葡萄球菌入侵宿主致病机制示意图

注：图片来自：Archer NK，Mazaitis MJ，Costerton JW，et al. Staphylococcus aureus biofilms：properties，regulation，and roles in human disease. Virulence，2011，2（5）：445-459 Epub 2011 Sep 1.

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）链球菌

链球菌(*Streptococcus*)是化脓性球菌中的另一大类常见的革兰阳性球菌，排列呈双或长短不一的链状。

链球菌的分类方法常用的有三种。第一种是链球菌在血琼脂平板培养基上生长繁殖后，按产生溶血与否及其溶血性质分为3类。在菌落周围形成草绿色溶血环者称为甲型溶血，这类链球菌是人类口腔中的常驻菌群，多为条件致病菌；菌落周围形成完全透明的无色溶血环者称为乙型溶血，这类链球菌致病力强，常引起人类的多种疾病；不产生溶血素，菌落周围无溶血环者称为丙型，这类链球菌无致病性。

第二种分类方法是按链球菌细胞壁中多糖抗原的不同，可分成A、B、C等共20个种群。对人致病的链球菌菌株90%左右属于A群。链球菌的群别与溶血性之间无平行关系，但对人类致病的A群链球菌多数呈现乙型溶血。还可根据对氧需求，分为需氧、兼性厌氧和厌氧三大类链球菌。

A群链球菌有较强的侵袭力，可产生多种侵袭性酶和外毒素。A群链球菌也称化脓性链球菌(*pyogenic streptococcus*)，或称溶血性链球菌。呈球形或椭圆形，直径0.6～1.07μm，呈链状排列。致病物质包括三大类：①细菌的胞壁成分：胞壁上的黏附素、脂磷壁酸(LTA)和纤维粘连蛋白结合蛋白(FBP)等与生物膜有高度亲和力，是该菌能定植在机体皮肤和呼吸道黏膜等表面的主要侵袭因素。M蛋白是A群链球菌细胞壁中的表面蛋白质组分，具有型特异性。当细菌侵入体内后，M蛋白的抗吞噬作用甚为重要。②外毒素：一旦病菌大量繁殖，链球菌溶素、致热外毒素等毒性物质发挥作用。③胞外侵袭酶类：透明质酸酶、链激酶、链道酶等侵袭性物质造成机体的多种病变。

（三）肺炎链球菌

肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)简称肺炎球菌(*pneumococcus*)，为革兰染色阳性，菌体呈矛头状，多呈双排列。该菌对温度抵抗力较弱，在52～56℃时加热15～20分钟即被杀死；对干燥的抵抗力较强，在阴暗处的干痰中可生存1～2个月。自然界中分布广泛，常生活在正常人的鼻腔中，多数不致病或致病力很弱，少数致病力较强。

金黄色葡萄球菌、A群链球菌和肺炎链球菌引起的口腔黏膜病损称为球菌性口炎(coccigenic stomatitis)，可发生于口腔黏膜任何部位，口腔黏膜充血，局部形成糜烂或溃疡。在溃疡或糜烂的表面覆盖着一层灰白色或黄褐色假膜，假膜特点是较厚而微突出黏膜表面，致密而光滑。擦去假膜，可见糜烂面，常称球菌性口炎为膜性口炎(membranous stomatitis)，周围黏膜充血水肿。患者唾液增多，疼痛明显，有炎性口臭，区域淋巴结肿大压痛。有些患者可伴有发热等全身症状。必要时，可作涂片检查或细菌培养，以确定主要的病原菌。

（四）淋病奈瑟菌

淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)又称淋球菌(*gonococcus*)，是人类淋病的病原菌，主要引起人类泌尿生殖系统黏膜的急性或慢性化脓性感染(图13-10)。淋病是危害性大的性传播疾病之一，也是我国目前流行的发病率最高的性传播疾病。

人类是淋病奈瑟菌的唯一宿主，成人淋病主要通过性接触，新生儿淋菌性口炎来自母体阴道感染。淋病奈瑟菌侵入泌尿生殖系统繁殖，男性发生尿道炎，女性引起尿道炎和子宫颈

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

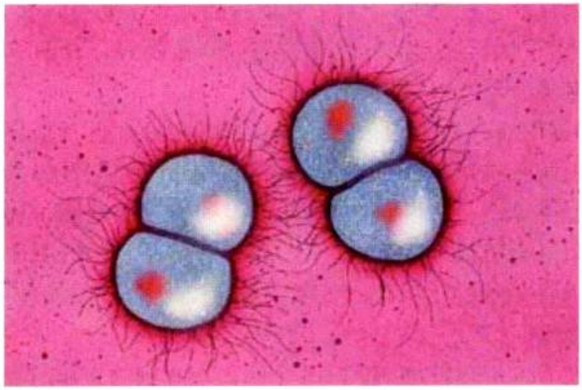


图 13-10　淋病奈瑟菌结构模式图

注:图片来自:the web site:http://pathol. med. stu. edu. cn/pathol/list EngContent2. aspx? ContentID=856

炎。淋菌性口炎和咽炎主要见于有口交和滥交史的患者,表现为全口黏膜充血、发红,有浅表溃疡,有黄白色假膜覆盖,假膜易于擦去,呈现出血性创面,唾液分泌减少,黏稠度增高。新生儿淋菌性口炎多由于新生儿产出时,接触到母体产道淋病损害而受到感染。

(五) 结核分枝杆菌

结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)简称结核杆菌(*tubercle bacilli*),是引起结核病的病原菌,可侵犯全身各个器官,以肺结核最为多见。

结核分枝杆菌不含内毒素,也不产生外毒素和侵袭性酶。其致病性主要与菌体成分、代谢产物的毒性以及造成机体的免疫病理损伤有关。致病物质包括:①脂质:脂质中的毒性成分有索状因子(cord factor)、磷脂、蜡质 D、硫酸脑苷脂和分枝菌酸等。索状因子具有破坏线粒体膜、影响细胞呼吸、抑制白细胞游走及引起慢性肉芽肿等作用;磷脂能刺激单核细胞增生,并能使病灶形成结核结节及干酪样坏死;蜡质 D 能引起迟发超敏反应;硫酸脑苷脂能抑制吞噬体与溶酶体融合,使结核分枝杆菌在吞噬细胞内能长期存活;分枝菌酸与分枝杆菌的抗酸性有关。②蛋白质:结核分枝杆菌含多种蛋白质,有的能使机体产生迟发型超敏反应,导致组织坏死和全身中毒症状,并参与结核结节的形成。③多糖。

口腔黏膜有时可能成为结核分枝杆菌首先入侵的部位。口腔黏膜的结核病损包括口腔黏膜结核初疮、口腔黏膜结核性溃疡、口腔寻常狼疮,其中以结核性溃疡最为常见。溃疡的特点是溃疡边缘微隆,界限清但不整齐,呈鼠啮状,并向中央卷曲,形成潜掘状边缘,基底可见暗红色桑葚样肉芽肿。

四、与口腔黏膜病相关的螺旋体

与口腔黏膜疾病相关的螺旋体主要有梅毒螺旋体和奋森疏螺旋体。

(一) 梅毒螺旋体

梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)又称苍白螺旋体,是引起人类梅毒的病原体。梅毒是性传播疾病中危害性较大的一种。梅毒螺旋体主要通过性接触传播,侵入生殖器黏膜或皮

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

肤后，进入淋巴和血液循环，播散到各器官。其他传播方式主要有口交、接吻、密切接触感染部位、输血、胎传等。潜伏期长短与接种量有关，3～90 天不等。在约 10%～20% 的患者，一期病损位于直肠内、肛周、口腔。

梅毒螺旋体有很强的侵袭力，其致病物质包括以下两方面：一是荚膜样物质，为菌体表面的黏多糖和唾液酸，阻止抗体等大分子物质与菌体结合，抑制补体的激活，干扰补体的杀菌作用，使机体免疫受到抑制；二是梅毒螺旋体产生的透明质酸酶，该酶参与梅毒螺旋体吸附于宿主细胞的过程，并分解组织、细胞基质内和血管基底膜的透明质酸，有利于梅毒螺旋体的扩散，破坏毛细血管，导致组织坏死、溃疡，形成梅毒特征性的病理损害。

（二）奋森疏螺旋体

奋森疏螺旋体（*B. vincentii*）纤细，有 3～8 个浅而不规则的螺旋，运动活泼。该螺旋体营养要求较高，需动物血清或腹水。

正常情况下，奋森疏螺旋体与梭形梭杆菌共同寄居于人牙龈部。当机体免疫力下降，如局部组织损伤或维生素 A、B_1、C 缺乏时，这两种细菌大量繁殖，协同引起樊尚咽峡炎、牙龈炎、溃疡性口炎、口腔坏疽等。

微生物学检查可采用拭子从局部病变处取材，直接涂片，革兰染色镜检，可观察到奋森疏螺旋体和梭杆菌共存，两者均为革兰阴性。

（曾昕　王智　但红霞　金鑫　陈谦明）

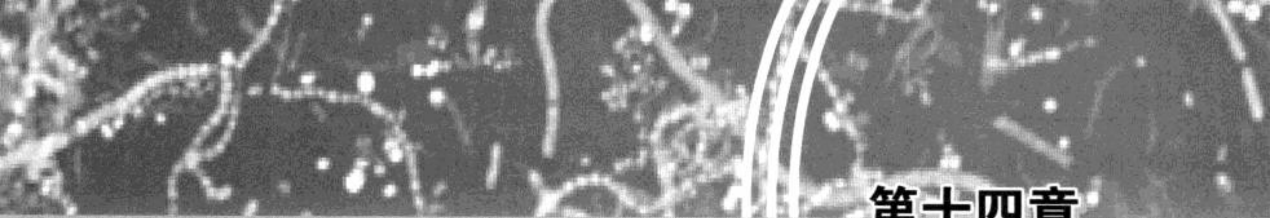
参考文献

1. 杨圣辉. 口腔疾病的微生物学基础. 北京：科学技术文献出版社，2008
2. Lydyard PM, Cole MF. The Immune System and host defense. In: Lamont RJ, Burne RA, Lantz MS, Leblanc DJ. Oral Microbiology and Immunology. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2006: 23-45
3. Dongari-Bagtzoglou A. Innate Defense Mechanisms in Oral Candidiasis. In: Fidel PL, Huffnagle GB. Fungal immunology from an organ perspective. New York: Springer, 2005: 13-35
4. Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, et al. Community lifestyle of Candida in mixed biofilms: a mini review. Mycoses, 2009, 52: 467-475
5. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008, 6: 201-208
6. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, et al. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. PLoS One, 2009, 4: e7967
7. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of Candida albicans. Trends Microbiol, 2004, 12: 317-324
8. Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. Periodontol 2000, 2009, 49: 39-59
9. Mohd Bakri M, Mohd Hussaini H, Rachel Holmes A, et al. Revisiting the association between candidal infection and carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. J Oral Microbiol, 2010, 2
10. Kohtaro Fujihashi, Hiroshi Kiyono. Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. Trends Immunol, 2009, 30: 334-343
11. Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases, International Congress Series 2005, 1284: 103-112

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

12. Dahlén G. Bacterial infections of the oral mucosa. Periodontol 2000,2009,49:13-38
13. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of Candida: a mini review. Oral Dis, 2008, 14: 582-590
14. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: Candida albicans and bacteria. FEMS Microbiol Lett, 2009, 299: 1-8
15. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. Clin Microbiol Rev, 2011, 24: 193-209
16. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. J Oral Pathol Med, 2008, 37: 107-121
17. Coogan MM, Greenspan J, Challacombe SJ. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. Bull World Health Organ, 2005, 83: 700-706

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



第十四章 口腔颌面部疾病的微生态

人是一个非常复杂的生态系统，身体内有数以万亿计的细菌和其他微生物存在，从数量上来讲，人体细胞仅仅只有共生于其机体上细菌等微生物数量的十分之一。这些微生物定居在皮肤、口腔、呼吸道、生殖道以及消化道等部位。正常情况下，这些共生细菌群落不仅不会危害健康，还是人体维持正常新陈代谢平稳所必需。

口腔微生态环境非常复杂。一般说来，子宫内没有细菌，所以生命之初的胎儿是真正无菌的个体，新生儿口腔一般也是无菌的。当新生儿通过产道时，母亲体内的共生细菌就会转移到婴儿身上，或者剖宫产后的婴儿与外界接触后可导致细菌的定植。早期定植的是唾液链球菌，随着乳牙的萌出，链球菌、葡萄球菌、奈瑟球菌、放线菌、乳杆菌、螺旋体及其他需氧或厌氧菌相继出现，儿童 10 岁左右菌群的定植过程基本完成并进入成人菌群阶段。

第一节 颌面部组织及生态学特点

口腔颌面部位于消化道和呼吸道的起端，通过口腔和鼻腔直接与外界相通。由于口腔、鼻腔、鼻窦的腔隙以及牙、牙龈、唾液腺、扁桃体的特殊解剖结构和这些部位的温度、湿度均适合微生物的寄居与繁衍，在健康状态下即有大量的微生物存在。而颌面部皮肤的毛囊、汗腺与皮脂腺也是细菌最常寄居的部位。口腔正常菌群甚至外来菌群的污染，并不一定会造成感染，只有这些有微生物存在的解剖部位因受到创伤、手术打击或者功能失常，再加上机体全身抵抗力下降等多因素影响时，正常菌群的微生态才会出现失调并导致局部组织的感染。

在解剖结构上，颌面部的软组织及颌骨周围还存在着相互连通的潜在筋膜间隙，这些筋膜间隙内大部分含有疏松的结缔组织，有利于感染病灶的扩散。颌面颈部存在为数众多的淋巴结，淋巴引流系统非常发达，在急性感染时微生物及其引发的炎性介质可沿相应淋巴引流扩散，造成区域性的淋巴结炎，感染的淋巴结一旦破损，或者感染直接扩散则形成相应区域的间隙感染。有时候一个局限的感染病灶如果控制与处置不及时，或者患者的抵抗力薄弱，可在很短的时间内通过上述通联的筋膜间隙扩散而造成颌面部多间隙感染，这种严重的感染有时会导致患者的生命危险。

口腔颌面部共生微生物种类繁多，包括金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、表型葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、β-溶血性链球菌、丙酸杆菌属（*Propionibacterium*）、棒状杆菌属（*Corynebacterium*）以及消化链球菌属（*Peptostreptococcus*）、梭杆菌属（*Fusobacterium*）等。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第二节　颌面部感染的微生态

颌面部感染主要包括智齿冠周感染、颌面部间隙感染(如眶下间隙感染、颊间隙感染、颞间隙感染、下颌下间隙感染、口底多间隙感染等)、颌骨骨髓炎、面颈部淋巴结炎、面部疖痈以及颌面部的特异病原菌感染如破伤风、结核、放线菌病、颌面部梅毒、HIV 感染(AIDS)继发的颌面部感染等。

颌面部感染的现代分类以其感染途径分为颌面部牙源性感染和非牙源性感染两大类。这种分类方法对了解感染途径、病原菌种类以及选择有效的治疗措施都较为有利。

一、牙源性感染

牙及牙周组织在解剖结构上与颌骨直接相连,所以未能控制的牙体或牙周袋感染可向根尖、牙槽骨、颌骨及颌面部蜂窝组织间隙扩散,由病灶牙的病原微生物引起颌面部的继发感染。病原菌通过病变牙或牙周组织进入颌面部引发的感染统称为牙源性颌面部感染或颌面部牙源性感染。

颌面外科临床最常见的牙源性颌面部感染首属智齿冠周炎,其他常见的牙源性颌面部感染有:由下颌智齿冠周炎及下颌磨牙尖周炎炎症扩散所致的咬肌间隙感染、翼下颌间隙感染、下颌下间隙感染等。拔牙后感染也被列入牙源性感染之列,因为牙拔除后形成的牙槽窝内血凝块容易滞留细菌并有助于细菌生长繁殖,引发拔牙后干槽症或牙槽窝感染,并可继发颌面部的其他感染。

(一) 牙源性感染的微生物学特点

牙源性感染的病原微生物主要由口腔正常微生物引起,由于局部生态环境的改变,正常生理组合被破坏,口腔正常菌群易位及异常增殖引发感染。

牙源性感染的微生物学特点可归纳为:①口腔正常菌群是主要病原菌。②厌氧菌是主要病原菌。Chow 等报道 31 例口腔颌面部牙源性感染标本的细菌学检查,专性厌氧菌检出率为 94%。肖晓蓉等报道 217 例牙源性颌面部感染的厌氧菌检出率为 95.85%。③很少单一菌感染,以混合菌感染多见。

(二) 智齿冠周炎的微生态

智齿冠周炎是指发生在智齿萌出过程中由于阻生或萌出不全时,在牙冠周围的软组织盲袋中的细菌感染造成的炎症。临床上以下颌第三磨牙冠周炎最为多见。

下颌第三磨牙是牙列中最后萌出的牙,因萌出位置不足,可导致不同程度的阻生。由于萌出不全,智牙牙冠可部分或全部为龈瓣覆盖,龈瓣与牙冠之间形成较深的盲袋,一般生活中的口腔护理清洁不了盲袋内滞留的食物残渣,因而为细菌提供了一个滋生的温床。覆盖在牙冠表面的牙龈组织在咀嚼时会受到创伤而形成溃疡,这些都是冠周炎发生的解剖学基础,当机体抵抗力下降的时候,冠周微生态系统就有可能失调,从而造成急性炎症发作。

临床上冠周炎分为慢性冠周炎与急性冠周炎两种。慢性冠周炎的患者除了可能有局部的轻微压痛外,一般无明显症状;急性冠周炎患者则肯定有程度不等的不适表现,如磨牙后区肿胀疼痛,这种疼痛会因颌骨的开口运动而加重,因此患者不愿咀嚼食物,甚至不愿吞咽;随着病情的进展加重,炎症表现随之更加厉害,患者局部可出现自发性的跳痛,并随耳颞神

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

经分布区域产生放射性疼痛，会严重影响其生活质量。当炎症从冠周扩散侵犯咬肌时，咬肌肌纤维会由于炎性介质的刺激而产生反射性的痉挛，出现不同程度的张口受限。进行体格检查时可见病灶牙区域牙龈红肿、冠周盲袋内分泌物明显增多，甚至是脓液形成。少数患者的急性冠周炎症如果突破局限性脓肿，则可直接蔓延或通过淋巴道系统扩散，造成骨膜下脓肿或间隙感染。

冠周炎有时候会由局限性的感染发展成威胁患者生命的严重感染，在极罕见情况下，这种牙源性的蜂窝组织炎迅速扩散，经颈部间隙下行造成纵隔的感染并向胸腔和心包扩散，即下行坏死性纵隔炎，预后差，死亡率高。国内文献报道，一旦出现此并发症，死亡率可高达25%～33.3%。因此，在处理时应该及时而且有效。在急性期应该使用抗生素并结合局部处理，在急性期过后需要拔除病灶智齿方能够解除风险。

引发冠周炎的微生物多为厌氧菌。厌氧菌广泛存在于人体，是人体正常菌群的重要组成部分，在口腔中，厌氧菌数量远远超过需氧菌。冠周炎的厌氧菌感染率与牙周炎一样可高达96.67%～100%，研究资料表明口腔厌氧菌感染主要病原菌为消化链球菌属、消化球菌属、脆弱拟杆菌、普雷沃菌（*Prevotella*）、放线菌属、丙酸杆菌属、厌氧链球菌、梭菌属、韦荣菌属、真杆菌属等。微小消化链球菌（*Peptostreptococcus micros*）又称微小微单胞菌（*Parvimonas micra*），是口腔中最常见的革兰阳性的专性厌氧球菌，也是目前公认的口腔颌面部牙源性厌氧菌感染（特别是冠周炎）的主要病原菌。在炎症情况下检测到的厌氧菌与口腔正常厌氧菌种群一致。因此，在临床上为了正确获得感染冠周炎的致病菌，应首先用无菌生理盐水漱口，再用消毒器械直接从冠周牙龈盲袋中的炎性分泌物取样做厌氧培养。

厌氧菌的取样、分离、培养和鉴定较为困难，需要较高的操作技能和特殊设备，有时还会有假阴性结果。综合文献报道发现有400余种细菌微生物与冠周炎有关。冠周炎急性发作时经常检测到的细菌有β-溶血性链球菌、普雷沃菌属（*Prevotella*）、消化链球菌属、拟杆菌属以及二氧化碳嗜纤维菌属（*Capnocytophaga*）等。没有临床症状的智齿并不意味着没有发生病理性变化。在无症状智齿牙周及龈沟液中可以检测出微生物复合菌群，这些菌群与患者进一步发展的难治性牙周炎有关。龈沟液中如前列腺素 E_2、白介素-1β 等炎性介质的检出标志着口腔慢性炎症的存在，并且与牙周炎相关，此时可以在智齿牙周发现大于5mm的牙周袋，很多患者的牙周炎最开始的部位可能就来自于智齿，然后逐渐向整个牙列发展。

在急性炎症期，一般的处理包括冠周冲洗以及抗生素的应用，而首选的抗生素则为β-内酰胺类。由于各个国家或地区的口腔医师应用抗生素的习惯不同，在冠周炎患者群体中检测到的耐药菌种情况也有区别。法国的一项研究报告显示，在26例冠周炎患者的分泌物检测的微生物中有9例患者被检测到耐β-内酰胺的菌群。另有学者研究了35例无全身系统性疾病成人冠周炎患者的感染细菌，冠周炎表现典型，并且在本次发病之前3个月没有使用抗生素的历史。结果发现盲袋平均深度（6.22±2.79）mm，肿胀、张口受限以及脓性分泌物的发生率分别为91%、50%和23%。从标本中检测到的微生物种类含量1～17种不等（平均10.5种±3.58种），仅仅在1例患者的冠周分泌物中只测得到一种细菌，为黏性放线菌（*Actinomyces viscosus*）。

冠周炎患者分泌物中提取的细菌尽管在健康人群中也存在，但是，这些细菌在耳鼻喉或者上呼吸道感染情况下更多见。只是在菌群的组成上，可以发现微量需氧菌和兼性需氧菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的比例明显上升，说明了菌群在向厌氧菌方向移行。这些结果也与采用DNA检测方法的结果相一致，即与正常无症状的萌出第三磨牙相比，厌氧细菌成分增加了。有意思的是，上段提及的研究中35个患者中有29例检测到放线菌的存在，虽然放线菌也是口腔正常菌群，其与龋齿及牙龈炎相关，更是与破坏性的疾病（如放线菌病）相关，尤其其中的衣氏放线菌（*Actinomyces israelii*）。该研究结果进一步证实引起冠周炎的致病菌是多重的，在考虑使用抗生素的时候要加入抗厌氧菌的药品。药敏试验发现，采用阿莫西林、螺旋霉素、普那霉素以及甲硝唑单用或联用，一般都有一定的效果。治疗口腔厌氧菌的药物主要有甲硝唑、替硝唑及奥硝唑，该类药的作用原理相同，吸收至体内血液循环后以具有细胞毒作用的原药和在肝脏代谢产生的中间代谢产物作用于厌氧菌的DNA，使其螺旋结构断裂或是阻断其转录复制而促使细菌的死亡。

肖晓蓉等发现150例急性冠周炎临床标本中厌氧菌的分离率为100%，优势厌氧菌为消化链球菌、产黑色素的厌氧杆菌、普雷沃菌、二氧化碳噬纤维菌和梭杆菌。局部应用替硝唑棒可明显抑制冠周炎的病原菌。甲硝唑与替硝唑棒均能对牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*）、中间普雷沃菌（*Prevotella intermedius*）、梭杆菌和消化链球菌等起抗菌作用，后者作用力度更强。在体内，局部应用替硝唑棒后冠周分泌物中的细菌数量和种类显著减少，患者的临床炎症症状也明显减轻。

检测冠周炎患者盲袋内的细菌，发现螺旋体和梭杆菌的比例明显高于健康侧，对冠周炎盲袋内容物进行厌氧菌培养，几乎均为阳性。无症状冠周炎患者、红肿伴触痛冠周炎患者和脓肿伴急性疼痛患者，用厌氧培养和暗视野显微镜对冠周微生物进行观察，无症状组螺旋体检出率为72%，另两组都为100%。采用聚合酶链反应检测冠周炎患者盲袋内的齿垢密螺旋体（*Treponema denticola*）、中间普雷沃菌和伴放线菌聚集杆菌（*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*）3种厌氧菌，并与健康侧对比，发现冠周炎盲袋内齿垢密螺旋体和中间普雷沃菌检出率高于健康侧，而伴放线菌聚集杆菌的检出率两组无差别。在一定程度上说明齿垢密螺旋体和中间普雷沃菌在冠周炎的发生发展中起重要作用。齿垢密螺旋体具有机械性穿入的能力，能产生致病性酶和内毒素，并抑制机体的免疫反应。许多研究表明，单纯用螺旋体接种实验动物，致病力弱，而将口腔螺旋体和其他厌氧菌混合感染，则可相互协同而发挥致病作用，产生明显的炎症反应，说明口腔螺旋体在混合感染中起十分重要的作用。

基因指纹技术可以获得某一微环境细菌菌群中基因组成的全部资料。变性梯度凝胶电泳（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）已经成为研究菌群指纹的常见技术之一。DGGE技术的最大优势是能够鉴别出碱基长度相同但是碱基序列不同的细菌种属DNA片段，从而获得未知样本中微生物群落图谱。应用该技术已有学者开始探索具有相似冠周炎急性炎症症状的不同个体之间或者是同一个体两次甚至多次感染发作急性冠周炎之间的致病细菌菌群结构是否存在差异。

二、非牙源性颌面部感染

非患牙或牙周组织所引起的颌面部感染被统称为非牙源性颌面部感染，包括除牙源性感染之外的所有颌面部感染。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(一) 非牙源性颌面部感染的主要类型

非牙源性感染的病原微生物比较单一，大多为医学微生物学中比较常见的病原微生物。感染按照来源可分为腺源性、损伤性、血源性、医源性感染以及颌面部的特异性感染。颌面部腺源性感染由颌面部淋巴结、腮腺、下颌下腺导管感染扩散所致，如颌面部淋巴结炎、唾液腺炎、腮腺炎等。颌面部损伤性感染是继发于颌面部损伤后，如刀器伤、火器伤、咬伤、颌骨开放性骨折或异物深嵌入颌面部所引起的颌面部感染。

血源性颌面部感染则由机体其他部位的化脓性病灶通过血液循环，或由菌血症所引起的颌面部软组织或颌骨的感染。医源性颌面部感染是指医疗行为（如手术、穿刺）引起的继发感染。颌面部特异性感染包括由放线菌、结核分枝杆菌、破伤风梭菌、HIV 等微生物引起的颌面部感染，如颌面部放线菌病、颌面部结核、破伤风、HIV 感染（AIDS）等。

(二) 颌面部非牙源性感染微生物学特点

颌面部非牙源性感染的途径明显不同于牙源性感染，所以其病原微生物也存在明显的差异，病原微生物被认为以皮肤定植微生物和外源性病原微生物为主，如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、不动杆菌、变形杆菌、克雷伯菌和铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）引起的颜面部疖痈；由破伤风梭菌引起的颌面部破伤风感染；结核分枝杆菌引起颌面骨结核和颈淋巴结核；腮腺病毒引起的流行性腮腺炎等。

非牙源性感染中，可能存在由口腔正常菌群引起的颌面部非牙源性感染。田中润一对 100 例口腔外科临床诊断为颌骨骨膜炎、疏松结缔组织炎及口唇脓肿等非牙源性颌面部感染患者的细菌学检查，厌氧菌检出率为 85%，厌氧菌和兼性厌氧菌混合感染率为 49%。肖晓蓉等对 30 例非牙源性颌面部感染（包括颌面疏松结缔组织炎、化脓性腮腺炎等）的细菌学分析结果显示：厌氧菌的检出率为 90%，以 2～3 种细菌的混合菌感染最多见，占混合感染的 62.96%。口颊坏疽的病原菌文森螺旋体和梭杆菌也是口腔常驻菌成员。

引起颌面部非牙源性感染的其他微生物主要有白假丝酵母菌和病毒。包括引起颌骨开放性骨折的假丝酵母菌感染、流行性腮腺炎的腮腺病毒、引起复发性唇疱疹的单纯疱疹病毒以及引起艾滋病的人类免疫缺陷病毒（HIV）等。

第三节　唾液腺非肿瘤性疾病的微生态

唾液腺非肿瘤性疾病主要包括舍格伦综合征、唾液腺慢性炎症和腮腺良性肥大。在结构与功能上，腮腺的良性肥大与正常腮腺无质的差别，因此在微生态上也与正常的腮腺无差异，唾液腺的舍格伦综合征和慢性炎症则出现了明显的微生态异常。

一、唾液组成与功能

唾液腺由 3 对大唾液腺（即腮腺、下颌下腺、舌下腺）以及位于口腔、咽部、鼻腔与上颌窦黏膜下层的小唾液腺组成。在正常情况下，所有腺体均能分泌唾液，一天的分泌量为 1000～1500ml，其中水分占 99% 以上。固体成分不足 0.7%，其中无机物为 0.2%，有机物为 0.5%。唾液中的无机物是一些电解质，主要为钾、钠、氯、磷酸钙及重碳酸盐，其次是在唾液中浓度小于 1mmol 的微量电解质，包括氟、硫氰酸盐、硫酸盐、镁、碘等等。唾液

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

pH 值在中性范围内波动，介于 5.6～7.6 之间，平均约为 6.8。唾液中的有机物主要是各种蛋白质、一些低分子量的有机物，如含氯的混合物、葡萄糖、脂肪等。唾液中的酶有淀粉酶、核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、过氧化物酶和溶菌酶、酸性磷酸酶等。唾液的主要功能为消化食物，同时具有润滑、保护、缓冲、机械清洁及抗菌作用。可是，从微生物的角度来讲，唾液同时又是细菌的培养基，使大量细菌聚集在口腔内，并在一定条件下会造成口腔的疾病发生。

唾液含有一些抗感染物质，其中包括免疫球蛋白，唾液中 IgG 和 IgM 的含量较低，但 IgA 的含量要比血清高出 100 倍，主要是由间质结缔组织中的浆细胞产生的分泌型 IgA（sIgA）。sIgA 在黏膜的局部免疫中发挥着重要作用，研究发现其抗鼻病毒和流感病毒的作用优于全身免疫，sIgA 联合巨噬细胞系统可以有效杀灭这些病毒。如果个体缺乏 sIgA，那么其对于引起浅表性黏膜病变的病毒则无免疫力。

溶菌酶在唾液中大量存在，也具有保护功能。溶菌酶是一种碱性蛋白，pH 大于 10，由分子量为 15 000 的多肽单链组成，能够水解革兰阳性菌细胞壁上黏多糖或黏多肽的某些成分，使细菌对溶解作用敏感，因而具有抗菌作用。唾液腺中还可合成分泌大量的过氧化物酶，主要是乳过氧化物酶。乳过氧化物酶同硫氰酸盐离子结合反应后产生的硫氰酸盐氧化产物能够使细菌蛋白中的硫醇基氧化而抑制细菌的生长，构成唾液的防御体系之一部分。主要起消化作用的 α-淀粉酶在唾液中也具有一定的防御作用，因为其能破坏淋病奈瑟菌细胞壁上的多糖。乳铁蛋白是一种铁蛋白，能够抑制依赖铁才能生长的细菌生长，具有一定的杀灭链球菌的作用。

二、唾液腺非肿瘤性疾病及其微生态特点

舍格伦综合征是一种自身免疫性疾病，其特征表现为全身外分泌腺的进行性破坏，导致黏膜和结膜甚至是皮肤的干燥，同时伴有各种自身免疫性疾病体征。在临床上，分为原发性舍格伦综合征和继发性舍格伦综合征两大类型，前者是指病变仅限于外分泌腺本身，后者是指病变除了累及外分泌腺外还伴有如类风湿性关节炎等其他自身免疫性疾病者。不管哪种类型的舍格伦综合征，其确切病因与发病机制尚不明确。目前的研究证据表明可能的病因包括以下三个方面：其一为机体免疫调节缺陷，既包括细胞免疫系统异常活跃，表现为激活的 T 细胞为主的单核细胞浸润，也包括多源性的 B 细胞激活，引起 γ 球蛋白血症、循环免疫复合物升高、产生自身抗体，引起炎症反应，造成外分泌腺体的破坏；其二为病毒性疾病改变外分泌腺体细胞表面的抗原性，刺激 B 细胞活化，产生抗体后引起炎症反应；其三则是前两种情况的共同作用，既有获得性的外源刺激因素，又有易于感染的特异性遗传因子的内在因素。舍格伦综合征在组织病理学上有三个特征性的表现，即腺实质萎缩、淋巴细胞浸润和肌上皮岛形成。使得腺体组织正常结构破坏，腺体分泌功能下降，而在一定程度上利于微生物的定植。

舍格伦综合征患者由于唾液量的减少等口腔局部因素和宿主免疫状态异常的全身因素，约 77% 的患者可并发口腔念珠菌感染且多次复发，反复不愈。临床研究发现口腔念珠菌病的发病率亦呈不断上升趋势，其主要致病菌是白假丝酵母菌（*Saccharomyces albicans*），该菌的菌种迁徙和菌株变异也出现多样性。目前临床常用的治疗口腔假丝酵母菌感染的有效

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

药物氟康唑是三唑类广谱抗真菌药，可是研究发现临床分离出的耐药菌株在不断增加，这也是导致治疗失败病例逐年增多的原因。闫志敏等采用随机扩增多态性 DNA 技术分析了 30 株舍格伦综合征患者口腔分离的对氟康唑敏感性不同的白假丝酵母菌基因型的差异，发现白假丝酵母菌种内多态性明显，对氟康唑敏感性不同的白假丝酵母菌指纹图表现为同一类型，氟康唑敏感株、剂量依赖株和耐药株基因型并未表现出异质性，菌株的耐药性与基因型之间缺乏相应的联系。有理由认为，作为条件致病菌，白假丝酵母菌的耐药现象的产生很可能在反复与药物的对抗中所逐渐产生了生物抗性，而并非遗传基础所致。提示在临床实践中应尽量避免反复多次不足剂量使用同一药物，避免长期大剂量应用唑类药物治疗及预防假丝酵母菌感染，以尽可能减少耐药现象的产生。

唾液腺慢性炎症一般发生于腮腺，包括慢性阻塞性腮腺炎和慢性复发性腮腺炎。慢性阻塞性腮腺炎又称腮腺管炎，大多数由局部因素引起，如导管周围受咬伤或者义齿损伤后瘢痕愈合导致导管狭窄，少数由于导管结石或导管内异物阻塞，最终造成阻塞部位近心端导管扩张、腺泡萎缩、导管腔内分泌物潴留，腺体排出不畅，也给微生物的定植繁衍提供了理想的场所。慢性复发性腮腺炎临床上常见，成人和儿童均可发病，成人的复发性腮腺炎为儿童复发性腮腺炎迁延未愈造成。儿童的复发性腮腺炎发病原因与先天性发育异常、免疫功能低下以及细菌的逆行感染密切相关。在病变早期主要为导管系统病变；病变中期导管周围炎症反应明显，结缔组织纤维化，淋巴细胞、巨细胞和组织细胞浸润；病变晚期，腺小叶结构逐渐破坏，被脂肪组织及结缔组织替代。患者会因反复的感染造成生活质量的干扰。尽管在发病机制上腮腺慢性炎症与舍格伦综合征不同，但它们却可导致相似的结果。腺体破坏，受累腺体分泌功能下降，使得唾液的机械冲洗和抗感染作用减弱，造成口腔内唾液中的微生物得以大量繁殖。通常情况下，正常腺体分泌的唾液中是不含细菌的。多数研究报道草绿色链球菌是儿童复发性腮腺炎的优势致病菌，而少数研究发现患儿中最多分离出的是肺炎链球菌和流感嗜血杆菌，正常对照组中分离出最多的却为草绿色链球菌。以往的研究发现腮腺慢性炎症受累腺体内有细菌潜伏，在临床缓解期存在隐性感染。有研究发现青少年复发性腮腺炎的患者在非发作期 80% 唾液标本中可培养出细菌，优势致病菌与发作期标本一致。

祁洁等在慢性复发性腮腺炎中细菌生物膜的扫描电镜研究发现，生物膜普遍存在于慢性复发性腮腺炎中，成为疾病复发的病灶；细菌、细胞外多糖以及细菌之间存在的通道共同组成生物膜的网状立体支架结构，保护生物膜内的细菌并为其营养代谢循环提供方便的途径。陈潇卿等应用厌氧培养系统以及抗生素药敏纸片法对 58 例腮腺急慢性炎症患者导管中段脓液进行了厌氧培养及药敏试验，结果发现腮腺感染多为混合感染，感染腮腺导管分泌液的厌氧培养阳性率极高，且兼性厌氧菌检出率明显高于专性厌氧菌；94.83% 的标本中检出厌氧细菌，共检出细菌 117 株，其中兼性厌氧菌 96 株，占可培养菌总数的 82.1%；专性厌氧菌 21 株，占可培养菌总数 17.9%。兼性厌氧菌中，链球菌检出率最高，为 51.7%；其次为奈瑟菌，检出率 48.3%；第三为葡萄球菌，检出率 29.3%。专性厌氧菌中韦荣菌和消化链球菌检出率最高，均为 8.6%。药敏试验证实临床较少应用的呋喃类药物敏感率最高，其次为氯霉素、氨苄西林或舒巴坦；青霉素和 1、2 代头孢菌素等临床普遍应用的药物均有一定程度的耐药性，尤以甲硝唑最为明显。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第四节 唇腭裂患者的口腔微生态

唇腭裂是口腔颌面部最常见的先天性畸形。根据我国出生缺陷监测中心1996—2000年的资料显示,新生儿的唇腭裂患病率为1.624∶1000。性别比例中男性多于女性,男女性别之比约为1.5∶1。

一、唇腭裂的解剖特点与治疗

在解剖结构上,正常上唇有完整的口轮匝肌结构,并与邻近的面部表情肌有着固有的连接,从而可以发挥吸吮及唇部各种细腻的活动。当上唇一侧的连续性发生中断时,两侧口轮匝肌不再围绕口周和患侧鼻翼基部。当两侧的上唇连续性都中断时,两侧的口轮匝肌因不能在中线连接而附着在两侧鼻翼基部,牵拉两侧鼻孔外展。患儿前唇发育短小,鼻小柱过短。出现睡眠时因口轮匝肌闭合不全导致口腔与外界直接交通。腭裂可单独发生,也可与唇裂同时发生。正常人体的腭部在解剖学上分为硬腭与软腭两部分,硬腭的主要结构为骨骼,介于鼻腔和口腔之间,其主要功能是将鼻腔与口腔分开,避免食物进入鼻腔和鼻腔的分泌物流入口腔,有利于保持口腔及鼻腔的清洁卫生。软腭由五对肌纤维组成一个完整的肌环,收缩时形成腭咽闭合,是语音、吞咽功能的重要解剖结构。腭裂患儿的硬腭在骨骼组成上与正常人的硬腭完全相同,但在形态上有显著差别,主要表现为腭穹隆部裂开,存在有程度不等的裂隙,前可达切牙孔,甚至到达牙槽突,裂开部位的硬腭与鼻中隔不相连,造成口、鼻腔相通;软腭裂开患者由于肌纤维附着异常,中断了腭咽部完整的肌环,无法形成腭咽闭合,造成口、鼻腔相通,同时也影响咽鼓管功能,导致吸吮、语音及听力等多种功能障碍。上述唇腭裂患者的解剖结构异常,也是导致患儿口腔或鼻腔微生态与正常人群有着一定差异的原因。

尽管唇腭裂的治疗强调序列治疗,即在患者从出生到成人的每一个生长发育阶段,有计划地分期治疗其相应的形态、功能和心理缺陷,但是外科手术治疗是修复唇腭裂唯一的重要手段。一般认为,进行单侧唇裂整复术最合适年龄为3~6个月,体重达6~7kg以上,双侧唇裂因手术较为复杂,一般主张患儿6~12个月再手术。手术的目的主要是恢复口轮匝肌的连续性,恢复上唇的外形。腭裂最佳手术时间仍存在争议,国内目前大多数主张在1.5岁左右手术。不管什么时候手术,腭裂整复术的主要目的是尽量恢复腭部的解剖结构,改善腭部的生理功能,重建良好的腭咽闭合功能,为正常语音、吸吮、吞咽以及听力等生理功能创造必要的条件。

二、唇腭裂患儿的口腔微生态特点

唇腭裂患者由于上述解剖方面的缺陷,通常不易自洁,而且口腔与鼻腔相通,为微生物的生长提供了合适的条件。虽然有部分研究报告唇腭裂患者患龋率、菌斑指数、牙龈指数与非唇腭裂人群无明显差异,但大部分的研究结果表明唇腭裂患者的患龋情况要比正常人群严重,且口腔卫生状况较差。有学者发现唇腭裂患者口腔中致龋性细菌数量要高于正常人群,单纯性唇裂或腭裂患者的患龋情况、口腔卫生状况要好于唇裂伴发腭裂的患者,而腭裂

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

患儿比单纯性唇裂患儿更易患猛性龋。腭裂患儿和正常儿童的对比研究发现,腭裂患儿的口腔卫生状况要差于正常儿童,腭裂患儿的食物清理时间明显变长,这使得唾液中蔗糖的浓度和淀粉分解来源的糖的浓度也高于正常儿童,唾液中与龋齿相关的微生物含量显著高于正常儿童,这也许就是腭裂患儿患龋率高的原因之一。研究报告18个月内的唇腭裂患儿的口腔中2种致龋菌,即变异链球菌(*Streptococcus mutans*)和乳杆菌菌种(*Lactobacillus spp.*)的检出率要高于对照组,这增加了患儿乳牙早期患龋的风险。

唇腭裂患儿的菌斑指数,特别是上切牙牙菌斑质素明显高于正常儿童,但变异链球菌与乳杆菌的检出率基本一致。有研究者对唇腭裂患者的口腔健康状况及白假丝酵母菌定植情况进行了研究,并与正常健康个体进行对照。口腔健康状况采用牙龈指数、牙菌斑、龋齿、牙列缺失及牙体充填等情况来衡量,同时在舌、颊及腭黏膜取材做白假丝酵母菌培养。结果发现整体上唇腭裂患者的口腔卫生状况明显比健康组差;63.3%的唇腭裂患者有白假丝酵母菌的定植,而健康对照组中只有18.3%的人有定植,两组间差异有显著性。手术超过3次的78.2%的唇腭裂患者会有白假丝酵母菌的定植,双侧唇腭裂者77.7%的患者会有定植。

三、唇腭裂患者手术前后口腔微生态的变化

唇腭裂患儿正畸治疗过程中唾液分泌质量以及口腔中微生态的平衡保持需要良好的口腔护理和护理教育。腭裂患儿如果在手术前接受正畸腭护板治疗,与不进行腭护板治疗的患儿相比,变异链球菌和乳杆菌会更早地定植在口腔中,尽管在患儿18个月大治疗结束时两组间差异不明显。Ariel等对唇腭裂患儿术前和术后12周的口腔微生物检测发现,唇腭裂患者术前口腔中葡萄球菌数量显著高于正常儿童,手术后该菌数量显著减少,与正常人群类似,唇腭裂患者草绿色链球菌数目在术前、术后口腔中无显著不同,均与正常人群类似。

与正常儿童相比较,唇腭裂患儿的口腔中金黄色葡萄球菌的定植比例较高,但在手术后12周,其定植数量会显著降低,说明手术可以帮助患儿口腔的微生态更加趋于正常。唇腭裂术后修复的儿童与正常的儿童相比较发现,患儿的口腔卫生状况较差,牙龈指数、菌斑数量以及牙周情况整体而言跟正常儿童相比有差距。尤其是那些在裂隙两侧的牙,其具有更深的牙周袋及明显的牙龈炎。有意思的是,龈下菌斑采样做厌氧菌及需氧菌培养后分析发现两组间的微生物组成上并没有显著的差别。朱万春等研究发现,已行外科手术的唇腭裂患者的龋坏程度好于未行手术者,提示手术有助于改善患者口腔卫生的维持,对预防龋病的发生有积极作用。

从唇腭裂伴发慢性化脓性中耳炎患者的中耳采集的分泌物做细菌培养,发现100%有细菌生长。共培养出57株细菌,其中最常见的是铜绿假单胞菌(35%),其次为金黄色葡萄球菌(15.5%)、粪肠球菌(14%)、奇异变形杆菌(12%)。革兰阳性菌为主,占67%。铜绿假单胞菌对环丙沙星高度敏感,而肠杆菌对庆大霉素敏感,金黄色葡萄球菌对亚胺培南高度敏感,肠乳酸菌对磺胺甲噁唑及甲氧苄啶敏感。另有研究者从伴发中耳炎的腭裂患儿研究发现,中耳分泌物的细菌培养68%阳性,尤其在3岁以下的儿童阳性率更高。最常见的是肺炎链球菌、黏膜炎莫拉菌B和流感嗜血杆菌。唯一培养出的厌氧菌是脆弱拟杆菌。

唇腭裂患儿的口腔微生态状况,直接影响其口腔卫生,而了解其口腔内定植细菌的特点更有利于手术整复的术后感染预防。对一组首次整复唇腭裂患儿术前的口腔微生态状况研

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

究发现，术前一周采集患儿鼻腔、咽喉、外耳道以及口腔的拭子样本进行细菌培养，如果采用培养出金黄色葡萄球菌和β-溶血性链球菌为阳性标准参照的话，有27.9%的患儿为阳性，主要是金黄色葡萄球菌。少部分为溶血性链球菌，对临床上围术期的抗生素预防性应用有一定的指导意义。

第五节　口腔癌微生态

口腔容易受到外界环境因素的影响，是许多微生物的定居场所。口腔中的细菌能够产生毒素、维持菌落pH值，或者形成机械屏障，阻止外来细菌的黏附、定居和增殖。在口腔黏膜癌变后，口腔黏膜菌落也发生相应改变，可能导致局部黏膜或者全身的感染。口腔也是HIV、EB病毒、HPV的感染部位，这些病毒可能参与口腔黏膜的癌变。最近研究证实20%癌症类型与微生物的感染有关。幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)与胃腺癌和MALT淋巴瘤的发生关系密切；伤寒沙门菌(*Salmonella typhi*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)分别与胆囊癌和肺癌有关；EB病毒导致鼻咽癌、Burkit淋巴瘤的发生；HPV与口咽癌发生联系紧密。这些证据说明，口腔微生物不仅仅是口腔炎症的致病性因素，也可能是口腔黏膜癌变的参与者。

一、口腔细菌与口腔癌

（一）口腔癌细菌菌群特点

口腔黏膜是一种异质性黏膜，由于功能差异，其角化程度和组织结构存在较大差异，客观上为细菌的生长提供了不同的环境，导致了不同口腔黏膜区域细菌谱的差异。舌背黏膜和舌侧黏膜、龈上菌斑和龈下菌斑存在着不同的优势菌落。肿瘤的微环境适合细菌的定居和生存，由于与正常组织存在差异，细菌菌落类型和数量也会相应发生变化。一个小型的病例对照研究显示，口腔癌和白斑中链球菌的相对丰度为22.3%，在对照组中非吸烟者和吸烟者的相对丰度分别为39.4%和40.1%。

口腔癌与非肿瘤组织的细菌构成差异明显。在口腔癌组织浅面能够分离出多种细菌，包括链球菌属(*Streptococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、莫拉菌属(*Moraxella*)、粪肠球菌(*Enterococcus feacalis*)、厌氧芽胞杆菌(*Anaerobic sporeforming bacilli*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、变形杆菌属(*Proteus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、白假丝酵母菌(*Candida albicans*)。

与正常口腔黏膜相比，在口腔癌组织浅面细菌具有较强的集落形成能力(3.85×10^5 CFU/ml、0.571×10^5 CFU/ml)。在口腔癌患者的唾液中结果类似(2.408×10^5 CFU/ml、0.78×10^5 CFU/ml)。Hooper等研究证实，口腔癌组织与正常黏膜主要存在糖分解细菌和耐酸细菌的差异，在口腔癌的深部组织存在一些少见细菌，如密执安棍状杆菌(*Clavibacter michiganensis*)、黄色植物杆菌(*Plantibacter flavus*)、栖热菌属(*Thermus*)。

唾液细菌谱可以反映口腔黏膜细菌感染情况，唾液中细菌检测可以作为一个替代标志物，用来分析口腔癌组织有关的病原菌或者微生物。Smruti等研究了口腔癌患者的唾液标本，分离和鉴定了多种口腔癌特异性细菌，包括乔氏放线菌(*Actinomyces georgiae*)、内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、二氧化碳噬纤维菌菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

种(*Capnocytophaga spp.*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、产黑色素普雷沃菌(*Prevotella malaninogenicus*)、极尖组织菌(*Tissierella praeacuta*)、坏死梭杆菌(*Fusobacterium necrophorum*)、溶血孪生球菌(*Gemella haemolysans*)、小单胞菌属(*Parvimonas*)、微小消化链球菌、牙龈卟啉单胞菌、普雷沃菌属、解糖葡萄球菌(*Staphylococcus saccharolyticus*)。其中产黑色素普雷沃菌、极尖组织菌、牙龈卟啉单胞菌与口腔癌关系密切,乔氏放线菌、内氏放线菌与生物膜的形成有关,其余与局部或是全身感染有关,如牙周疾病、心内膜炎、肠炎、脑膜炎、扁桃体炎、牙源性感染、败血症等。

(二) 口腔细菌与口腔癌的演进

据 HOMD 记录口腔有 1 门古菌 12 门细菌,共 179 属 645 种原核生物,这些细菌可以通过引起慢性炎症发挥致癌作用,如牙周病。流行病学证实,伴有牙周病患者,其口腔癌及消化道癌症的发病风险显著增加,牙周疾病与牙龈癌临床表现相似,有的病例甚至同时发生牙周病及牙龈癌。研究发现正常牙龈组织及牙龈癌中都可以检测到牙龈卟啉单胞菌的表达,但肿瘤组织中细菌数量显著增多,说明细菌及其造成口腔健康状态的改变,可能是黏膜癌变的促进因素。

动物模型中,已经验证某种类型细菌能够引起消化系统的癌症。Ward 等在小鼠模型上,进行幽门螺旋杆菌感染肝脏实验,感染后小鼠表现为慢性活动性肝炎,随着肝炎的持续进展,病变逐步转化为肝癌;柠檬酸杆菌感染肠道,经历慢性肠炎后,同样导致了结肠癌的发生。目前还没有动物模型能够说明口腔内细菌能够直接导致口腔癌的发生。口腔内细菌可能不是口腔癌发生的一个独立影响因素,需要其他协同因素共同作用。

口腔细菌导致口腔黏膜发生癌变的可能机制:

1. 口腔内细菌在定居部位能够产生多种具有宿主细胞毒性的物质,例如内毒素、蛋白酶、胶原酶、硫化氢等等。这些毒性物质在菌落中逐渐累积,能够诱导定居部位的上皮细胞发生基因突变,或者改变上皮细胞与细胞外基质的信号的传递,影响上皮细胞增殖或者存活。

2. 口腔内细菌参与吸烟和饮酒过程中致癌物的局部代谢,增强其致癌能力。吸烟和饮酒是口腔癌发生的两个主要因素,但是乙醇和烟雾并不是一种强致癌物,其中致癌物质的转化是致癌的关键步骤。口腔内细菌能够将乙醇转化为乙醛,使口腔黏膜直接暴露于致癌物;多数口腔内细菌能够激活烟草中亚硝胺类及亚硝基二乙胺形成具有致癌能力的羟基化物。

3. 口腔内细菌能够激活宿主的间质细胞,间接发挥促癌作用。细菌能够激活的细胞包括中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞、成纤维细胞等等,激活后的细胞一方面可以产生过氧化氢、氧自由基、一氧化氮、丙二醛、基质金属蛋白酶等物质,造成上皮细胞 DNA 损伤。由于细菌的参与,可以引起局部黏膜的免疫应答,其效应因子可以改变上皮细胞的增殖状态。

虽然细菌在口腔癌演进过程中的作用还不能定论,但是在口腔癌中,黏膜的完整性遭到破坏,慢性炎症始终贯穿于口腔癌的各个阶段。研究显示,口腔癌组织中的细菌不仅在局部可以检出,在颈部转移的淋巴结中也能够分离到这些细菌。这也说明,口腔内细菌是一个口腔癌微环境中的一种成分,其在癌细胞周围构成了一个新的细菌微生态,支持口腔癌细胞的演进。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

（三）口腔癌细菌研究的意义

口腔癌中细菌微生态的研究处于一个起步的阶段，学者也逐步认识到了口腔癌细菌研究的必要性和意义。首先，建立口腔细菌与口腔癌的联系，能够进一步完善口腔癌病因学的认识，可以通过对细菌进行干预，达到预防癌症的目的。由于在正常黏膜和口腔癌之间存在细菌谱的差异，可以通过对易感人群进行唾液中细菌成分进行检测，获得非侵入性的癌标志物，实现对口腔癌的早期诊断。获得口腔癌的细菌感染信息，可以对肿瘤患者的感染进行合理用药，尤其是对进行放化疗后的口腔癌患者更具有意义。随着放化疗在口腔癌治疗中的广泛应用，治疗后由于免疫抑制引起的继发感染逐渐增多，尤其是在中性粒细胞减少的患者中。研究显示，肿瘤放化疗后菌群变化明显，金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白假丝酵母菌成为优势菌群。由于广谱抗生素的应用，更容易导致这些患者产生广泛抗生素耐药，并且个体间耐药变异很大。因此，口腔癌细菌微生态研究是解决肿瘤患者有效进行抗感染治疗的关键。

二、口腔病毒感染与口腔癌

吸烟及饮酒是口腔癌发病的重要因素。口腔卫生不良、细菌、病毒等微生物感染也与口腔癌的发生和发展关系密切。一份对口腔癌患者病毒感染的调查表明，在 155 名来自不同国家、不同种族、具有不同社会经济背景的口腔癌患者中，EBV、HPV、HSV 的感染率分别为 55%、35% 和 15%，其中 34% 的患者存在多重病毒感染，常见的是 HPV 和 EBV 双重感染，占所有口腔癌病例的 21%。这些证据说明，在口腔中除了细菌的定居和增殖，病毒也是构成口腔癌微生态的一个重要组成部分，病毒感染可能是口腔黏膜癌变的一个危险因素。近年来，针对口腔黏膜病毒感染与癌变的研究主要是集中在 HPV，相关内容将重点叙述。

（一）HPV 病毒的生物学特点

HPV 是一种嗜上皮的双链闭环 DNA 病毒，由核酸和衣壳蛋白组成。其基因组包含 10 个开放阅读框（ORF），分为早期区（E 区）、晚期区（L 区）和上游调节区（URR）。E 区包含 E1、E2、E4、E5、E6 及 E7 等 6 个早期基因，编码蛋白负责病毒转录、复制和转化的调控；L 区包含 L1 和 L2 基因，编码主要和次要衣壳蛋白。HPV 病毒至少有 120 余种亚型，主要感染移行上皮，包括上消化道、呼吸道和肛门、生殖器区。其中 15 种具有致癌作用，根据它们的致癌性，分为高危型（如 HPV16、18、35、52）和低危型（如 HPV6、11）。

HPV 是宫颈癌、外阴及阴道癌、阴茎癌和口咽癌的一个致病因素。HPV 感染的长期存在能够导致癌前病变及癌症的发生，其中高危亚型主要与子宫颈和肛门、生殖器的癌变有关，低危亚型与肛门、生殖器区湿疣和喉乳头状瘤有关。HPV 能够诱导上皮细胞发生永生化和恶性转化，这种作用主要是依靠 E6、E7 癌蛋白。美国联邦疾病控制和预防中心（Centers for Disease Control and Prevention，CDC）研究表明，2004—2008 年之间，每年约有 33 369 例发生 HPV 相关癌症，年发病率 10.8/10 万。其中，男性 12 080（年发病率 8.1/10 万），女性 21 290（年发病率 13.2/10 万）。

（二）HPV 感染与头颈鳞癌

1983 年，Stina Syrjanen 等发现 40% 的喉癌和口腔癌患者在组织形态学上与 HPV 感染病损相似，并且检测到肿瘤组织中缺失存在 HPV 感染，提出 HPV 可能是头颈鳞癌发生的一个

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

危险因素。根据 Kreimer 和 Termine 的数据，估计在头颈鳞癌患者中，HPV 感染率为 26% ~ 34.5%。在头颈鳞癌中，HPV 感染常见的感染部位是口咽部，其次是口腔、喉，HPV16 是最主要的感染类型。流行病学调查显示，在发达国家，HPV 相关的头颈鳞癌发病率逐步上升，同时非 HPV 相关癌症发病率逐渐降低；HPV 相关头颈鳞癌常见部位是扁桃体和口咽，年轻患者，具有较高的社会经济地位；性传播被认为是 HPV 传播的主要模式，口腔 HPV 感染可以通过性途径获得，较多性伴侣、口交、舔肛等行为及生殖器疣都可以增加头颈鳞癌的发病风险。吸烟是促进 HPV 感染头颈癌患者发病的一个危险因素，戒烟可以降低其发病率；在免疫缺陷或者免疫抑制的人群，如 HIV 阳性和器官移植的患者，口腔 HPV 感染率显著增加，与头颈鳞癌的发病率上升有关。

确认 HPV 与头颈鳞癌发病的关系是过去十几年中，头颈癌病理生理学取得的重要理论进展。目前认为 HPV 阳性鳞癌患者是头颈鳞癌中一个独立亚类，与 HPV 阴性的患者具有不同的发病特点、病程和预后。有学者认为，根据是否具有 HPV 感染，可以将头颈鳞癌分成 2 个亚类：①角化的头颈鳞癌：HPV16 阴性，TP53 突变，伴有或者不伴有 P53 蛋白表达。该类型鳞癌主要发生在老年人，有饮酒及吸烟习惯，病程进展较快；②非角化的头颈鳞癌：HPV16 阳性，p16 阳性，p53 阴性。该类型鳞癌发生在 40 ~ 60 岁之间，甚至更年轻，无饮酒及吸烟习惯，多个性伴侣、口交等性行为是发病危险因素，患者治疗效果及预后较好。当然，也有学者建议，除了根据是否有 HPV 感染进行分类，还需要根据 p16 的表达水平对头颈鳞癌进一步分类，因为 p16 的表达水平反映了 HPV 感染后是否处于失活状态。Weinberger 等将头颈鳞癌分成 3 个亚类，HPV 阴性/p16 低表达、HPV 阳性/p16 低表达、HPV 阳性/p16 高表达。研究发现，这三类肿瘤细胞具有不同的分子表型，肿瘤演进相关蛋白存在差异。此外，患者的生存率也存在较大差异，HPV 阳性/p16 高表达组，总生存率 79%；HPV 阴性/p16 低表达、HPV 阳性/p16 低表达组，总生存率分别为 18% 和 20%。目前 HPV 阳性的头颈癌患者具有良好的治疗效果和预后的确切机制还不清楚，可能与以下因素有关：HPV 感染的癌细胞，基因组具有良好的稳定性；HPV 感染的癌细胞在缺氧的环境下，更容易发生凋亡；肿瘤局部治疗措施增强了局部免疫应答，有利于去除 HPV 感染和肿瘤消退。

（三）HPV 致癌的分子机制

高危 HPV 感染与其他致癌因素具有协同作用，病毒感染的持续存在可以促使复层鳞状上皮发生恶性转化，主要是由于 HPV E6、E7 基因表达产物造成的。这两种蛋白的主要功能就是可以造成 p53 和 pRb 失活，导致 p16 INK4A 过度表达，细胞异常增殖。体外实验证实，抑制 E6、E7 的表达，能够恢复 p53 和 pRB 抑癌作用，降低细胞的增殖能力。E6、E7 的表达是 HPV 病毒与宿主细胞基因组进行整合的结果，受到病毒拷贝数目及病毒整合位点的影响。但更重要的是，在整合过程中伴随着一些调控基因及非关键基因的缺失，包括晚期基因（late genes L1、L2）和一些早期基因（early genes E1、E2）经常缺失，其中 E2 能够抑制调节的 E6、E7 表达，激活 p53 和 pRb 信号途径，降低端粒酶活性，抑制细胞生长。此外，HPV 病毒基因的表达容易受到宿主表观遗传机制的修正和影响。在多数 HPV16 阳性的头颈鳞癌中，病毒表观基因组处于低甲基化状态，特别是在病毒调节区域，造成 E6 和 E7 持续表达在癌细胞中，维持细胞的恶性表型。对于口腔黏膜细胞来说，HPV16、HPV18 具有转化正常口腔黏膜细胞的能力，导致黏膜细胞呈永生化状态，但永生化的黏膜细胞只有进一步地暴露于致癌因

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

素，才能发生恶性转化。

（四）口腔 HPV 感染与口腔癌

口腔癌主要是发生在 50～60 岁之间的男性，吸烟和饮酒是最常见的致病因素。在过去 20 年中，在年轻人群中（小于 40 岁）口腔癌的发病率有所增加。由于年轻人暴露于烟酒因素时间较短，这些致癌因素的作用是不确定的，因此有的学者认为，在年轻人群中，特别是 30 岁以下人群中，口腔癌的发病可能与 HPV 感染有关。Kreimer 等进行了口腔癌 HPV 感染系统评价，共纳入 2642 口腔癌患者，其中 24% 的患者存在高危 HPV 感染，感染病毒的主要类型是 HPV16，仅有 3.6% 的患者存在多种 HPV 亚型的感染。其他研究也证实，相对于 60 岁以上老年人，年轻人群中高危 HPV 感染率较高，这可能与两者之间性行为特点的差异造成的。过早发生性行为、多个性伴侣、深吻及口交都是口腔 HPV 感染的危险因素。HPV 在口腔和生殖器之间传播是可能的，因为在口腔和生殖器可以检测到相同类型的 HPV，但是一份女性性工作者的临床调查研究显示，在 12 名口腔感染 HPV 的患者中，只有 2 名患者 HPV 基因型与宫颈感染一致，这说明口腔和宫颈 HPV 感染也可能是两个独立的时间，口腔传播也是 HPV 感染的一条途径。

HPV16、HPV18 被认为是宫颈癌的主要致病因素，但是口腔和宫颈黏膜之间存在显著的差异。口腔长时间暴露于烟草、乙醇等致癌物，它们是致癌的主要因素，相对于宫颈癌，口腔 HPV 感染在致癌过程中的作用不是十分突出。因此，口腔 HPV 感染在口腔黏膜癌变中的作用是存在争议的。多数学者认为，在口腔癌中，HPV 感染与口腔癌的发生具有因果关系。与其他致癌物引起的口腔癌相比，HPV 阳性口腔癌中存在不同的癌变机制，而且该亚类患者具有不同的临床和病理特征，具有良好的预后和较长的生存期。一份 Meta 分析显示，在口咽及口腔上皮异常增生中，HPV16/18 总感染率是 24.5%；在口腔黏膜异常增生中，HPV16/18 感染率 25.3%。与正常组织相比，在异常增生或者侵袭癌的患者中，HPV16/18 感染率要高出约 3 倍，不同程度上皮异常增生和侵袭癌之间，HPV16/18 感染率没有显著的差别。Syrjanen 等对 HPV 感染与口腔癌及癌前病变和状态进行的相关性进行了系统评价。纳入口腔癌 1885 例，癌前疾病 956 例。研究结果显示，HPV 感染导致口腔癌的相对危险度是 3.98（95% CI：2.62～6.02），高危 HPV16 感染的相对危险度是 3.86（95% CI：2.16～6.86）。HPV 感染导致口腔白斑、口腔扁平苔藓、上皮异常增生的相对危险度分别是 4.03（95% CI：2.34～6.92）、5.12（95% CI：2.40～10.93）、5.10（95% CI：2.03～12.80）。这些证据说明，在口腔癌的早期阶段，HPV 感染已经存在，与癌前病变及口腔癌具有因果关系，在口腔黏膜上皮的恶性转化过程中发挥作用。

对比研究口腔黏膜乳头状病损和疣状癌中 HPV 的感染情况。在疣状癌及良性乳头状增生的病例中，HPV 阳性率分别是 58.8% 和 13.9%，进一步支持了 HPV 感染与上皮恶性转化密切相关。在口腔癌高发国家印度，HPV 感染率很高。研究显示，在口腔癌患者中，70.6% 患者存在 HPV 感染，其中 HPV16 阳性率是 45.8%，HPV 18 阳性率是 54.2%，HPV 16、18 共同感染是 4.18%。而在正常人群中，HPV16 和 HPV18 的阳性率仅为 2.75%、22.0%。HPV 感染不能反映病毒是否处于活动期，Elango 等发现在舌癌中 HPV 感染率是 48%，其中发生病毒整合的病例为 67%，在 33% 和 52% 的患者中可以检测到 E6-p53、E7-pRb的相互作用，说明 HPV 在口腔癌中不仅是处于感染状态，而且病毒呈活动状态调节

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

上皮细胞的增殖。

也有学者对 HPV 的致癌作用持怀疑态度，他们认为 HPV 不是口腔癌的一个致病因素，或者 HPV 仅仅在少数口腔癌病例中发挥作用。这主要是因为在他们的研究中，HPV 感染率较低。Ishibashi 等调查了口腔癌前病变及口腔癌中 HPV 的感染情况，在口腔癌前病变中，HPV 感染率为 26.3%，口腔癌为 18.0%。HPV16/18 在口腔癌中的阳性率低于 4%。在疣状癌和异常增生中，即使检测到了病毒的整合，也没有检测到 p16 蛋白的过表达，说明口腔癌的 HPV 感染不是一个普遍现象，口腔癌的癌变也不是 HPV 病毒感染造成的。

对于上述两种试验结果和结论，作者认为主要是由于试验过程中的偏倚造成。首先，多数的研究文章采纳的病例数较少；其次，没有充分排除吸烟、饮酒、机体免疫状态等因素可能造成 HPV 感染的差异；第三，HPV 检测还没有一个标准的方法，不同检测手段获得的数据可比性较差。目前，HPV 检测方法包括共同序列或者亚型特异序列的 PCR 技术、原位杂交检测 HPV DNA、免疫组化检测替代标志物等等。在具体应用过程中不仅要考虑方法的敏感性和特异性，还要考虑取材组织的可用度及标准化的问题。

根据 HPV 流行病学、分子病理学及动物实验等证据，我们认为在头颈鳞癌的特定亚类中存在病毒与癌症发生的因果联系。口腔癌中的 HPV 目前还没有证据表明能够单独致癌，需要其他致癌因素协同作用。正确评估口腔癌中 HPV 的作用，有助于口腔癌预防、早期治疗方法的选择。

（潘剑　张壮　肖晓蓉）

参 考 文 献

1. 邱蔚六. 口腔颌面外科学. 北京：人民卫生出版社，2008
2. 祁洁. 细菌菌膜与慢性复发性腮腺炎发病机制的研究. 四川大学硕士学位论文，2002
3. 陈潇卿. 感染腮腺导管分泌物厌氧菌的初步研究. 上海交通大学硕士学位论文，2006
4. 梁析，倪锋，陈绍明，等. 牙源性下行性坏死性纵膈炎临床分析. 上海交通大学学报（医学版），2006，26：1199-1200
5. 孙涛，王松灵，杨圣辉，等. 腮腺非肿瘤性疾病混合唾液和腮腺液的细菌学研究. 现代口腔医学杂志，2000，14：320-322
6. 闫志敏，徐岩英，华红，等. 舍格伦综合征患者口腔白色念珠菌耐药性与基因型的研究. 实用口腔医学杂志，2007，23：191-194
7. 赵妍妍，侯本祥. 唇腭裂患者龋病易感性的研究进展. 北京口腔医学，2010，18：56-58
8. Sixou JL，Magaud C，Jolivet-Gougeon A，et al. Evaluation of the mandibular third molar pericoronitis flora and its susceptibility to different antibiotics prescribed in france. J Clin Microbiol，2003，41：5794-5797
9. Kuriyama T，Karasawa T，Nakagawa K，et al. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod，2000，90：600-608
10. Friedman JW. The prophylactic extraction of third molars：a public health hazard. Am J Public Health，2007，97：1554-1559
11. Chuo CB，Timmons MJ. The bacteriology of children before primary cleft lip and palate surgery. Cleft Palate Craniofac J，2005，42：272-276
12. Arief EM，Mohamed Z，Idris FM. Study of viridans Streptococci and Staphylococcus species in cleft lip and palate patients before and after surgery. Cleft Palate Craniofac J，2005，42：277-279

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

13. Panghal M, Kaushal V, Yadav JP. *In vitro* antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2011, 10:21
14. Ishibashi M, Kishino M, Sato S, et al. The prevalence of human papillomavirus in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in comparison to cervical lesions used as a positive control. Int J Clin Oncol, 2011, 16:646-653
15. Stokes A, Guerra E, Bible J, et al. Human papillomavirus detection in dysplastic and malignant oral verrucous lesions. J Clin Pathol, 2012, 65:283-286
16. Kristoffersen AK, Enersen M, Kverndokk E, et al. Human papillomavirus subtypes in oral lesions compared to healthy oral mucosa. J Clin Virol, 2012, 53:364-366
17. Solomides CC, Bibbo M, Wang ZX. Assessment of fine needle aspiration specimen adequacy for high-risk HPV detection and genotyping in oropharyngeal squamous cell carcinoma. Acta Cytol, 2012, 56:196-198
18. Syrjänen S, Lodi G, von Bültzings Löwen I, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systemic review. Oral Dis, 2011, 17(suppl1):58-72

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第十五章 口腔正畸及修复的微生态

第一节　正畸和修复材料的生态学

正常情况下,口腔微生物与宿主之间保持着生态平衡。不同的个体之间或同一个体在不同时期,口腔微生态体系存在一定差异,但均处于健康、动态、平衡状态。牙颌面畸形或牙列缺损之后,正畸矫治或义齿修复材料的置入,会导致口腔微环境的改变,比如正畸矫治器妨碍口腔清洁和自洁、生物材料在唾液浸泡下发生腐蚀现象渗出金属离子、材料表面粗糙的点隙沟凹为口腔微生物提供了遮挡等。这些生物材料不仅改变了口腔微环境,而且也为口腔微生物的黏附定植提供了更多的黏附表面和可乘之机,从而影响口腔微生态的动态平衡,口腔微生态系的质、量、菌群比例、生物膜结构等发生变化。

一、生物材料对口腔微生态的影响

良好的口腔正畸或修复材料因其具有生物相容性和生物安全性,所以对口腔微生物的生长及定植影响不大。通常,正畸矫治器或修复体置入口腔后,尽管微生态系发生不同程度的改变或波动,但在宿主自身口腔卫生维护和免疫系统调节下,微生态系仍能与宿主之间保持平衡状态,维持口腔健康。口腔生物材料的抗腐蚀性、抗溶解性、非微生物利用性等对口腔微生态的平衡十分重要。

若置入的生物材料对口腔微生物的黏附定植、生长代谢等具有促进或抑制作用,则可能引起某些口腔微生物的增减或不同菌群之间比例的变化,如果宿主调节系统未能代偿这种改变,那么口腔微生物与宿主之间的微生态平衡就会被破坏,口腔微生态失衡,导致相关口腔疾病的发生。

固定正畸矫治器粘接在牙面上之后,严重妨碍了口腔清洁和自洁,临床观察和扫描电镜检测发现,微生物容易聚集在刻痕、沟纹等表面粗糙的部位,这些部位不仅增加了微生物的接触面积,而且很难被刷牙漱口等口腔卫生措施清理干净,因此微生物可以在此黏附聚集、生长繁殖形成生物膜。正畸矫治器(尤其是托槽周围)因此成为口腔微生物藏身繁殖的重要场所,一旦患者不能保持良好的口腔卫生,矫治器及其周围的牙齿表面就会堆积很多生物膜,正常口腔微生态平衡被打破,导致在正畸过程中或拆除矫治器之后,牙齿发生脱矿(龋病)、牙龈炎或牙周炎等疾病,影响到50%～70%的正畸患者。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、生物材料对口腔正常微生物的影响

生物材料置入口腔之后，可以对微生物的黏附、生长繁殖产生不同程度的影响，这些影响与生物材料表面的理化性质和微生物的种类、特性等有着密切的关系。生物材料对口腔微生物黏附的影响主要表现为不同的材料表面粗糙度、疏水性、化学组成、唾液膜，其表面黏附的微生物的种类、数量等不同。

通常情况下，粗糙的生物材料表面比光滑的表面更容易黏附细菌，这可能是因为粗糙材料的表面积相对较大，不利于清洁的低洼之处便于细菌藏身，材料表面的粗糙度越大，细菌与材料表面形成的黏附结合位点也越多，其表面的细菌黏附力也越大。当牙科光固化树脂的粗糙度从 50～350μm 逐渐增加时，其表面链球菌的黏附力也随之增加，并呈直线相关性；但也有学者研究了粒度从 120～1200 不同砂纸抛光后的纯钛表面，没有发现不同粗糙度对表皮葡萄球菌的黏附影响不同，指出当材料的表面粗糙度大于 200nm 时，粗糙度才会对表皮葡萄球菌的黏附和聚集产生影响。

材料表面疏水性影响细菌黏附。通常疏水性材料表面更容易黏附疏水性细菌，亲水性材料表面更容易黏附亲水性细菌。研究发现，疏水的塑料比亲水的金属更容易黏附细菌；血链球菌更容易与疏水性的玻璃黏附。玻璃上涂上一层蛋白膜（如牛血清清蛋白、糖蛋白等）之后，表面疏水性降低，细菌黏附也相应减少。口腔细菌在疏水性较大的不锈钢表面黏附力明显强于在疏水性较低的牙齿表面。

材料的化学组成影响细菌黏附。Sugarman 和 Musher 发现，肠表面黏附细菌数多于聚乙醇酸缝线和丝线，多于尼龙线；Brusca 发现合成材料上黏附的细菌数大于陶瓷、金属。Fournier 发现变异链球菌与金属的黏附量最少，与塑料和陶瓷的黏附量较多。

唾液膜的覆盖使链球菌黏附减少。唾液膜的覆盖会不仅显著降低链球菌与不锈钢、树脂粘接剂、釉质等牙科材料的黏附力，而且也不同程度地减少了细菌黏附数量。加之唾液的流动对材料表面具有冲刷自洁和缓冲作用，有学者称这是宿主唾液的自我防御和保护作用，对口腔微生态的调节和平衡具有积极意义。

第二节　正畸矫治的生态学

随着人们物质生活水平的不断改善，对美的渴望和要求不断提高，寻求正畸治疗的患者日益增多。但是，正畸中固定矫治器在排齐牙齿带给患者一口美丽微笑的同时，也为口腔细菌黏附和生物膜的形成提供了更多的可乘之机。固定在牙齿上的正畸矫治器，如托槽、弓丝、结扎丝、橡皮圈等，不仅妨碍了口腔的自洁功能，也使患者刷牙等口腔清洁措施更加困难，同时也为细菌生物膜的黏附提供了更多的表面和机会。

一、正畸矫治的生态学问题

佩戴固定矫治器后患者牙菌斑（生物膜）指数大幅度上升，牙齿脱矿和牙龈炎发生的危险性显著增加。如果患者不能保持良好的口腔卫生清洁，细菌就会不断黏附聚集、繁殖代谢分泌胞外基质，形成生物膜。生物膜代谢产酸，造成局部 pH 下降，可导致患者在正畸中或拆

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

除矫治器之后，托槽周围牙齿白垩色脱矿、牙龈炎，甚至龋洞（图 15-1），其中上颌侧切牙托槽周围发病率最高。尽管现在已有很多新的正畸材料和防治措施应用于临床，正畸中治疗中牙菌斑生物膜引起的牙齿脱矿、牙龈炎等严重并发症仍居高不下，影响到 50% ~70% 的正畸患者。这些并发症的发生，不仅使正畸治疗的效果大打折扣，而且严重影响了患者的口腔健康和生活质量。

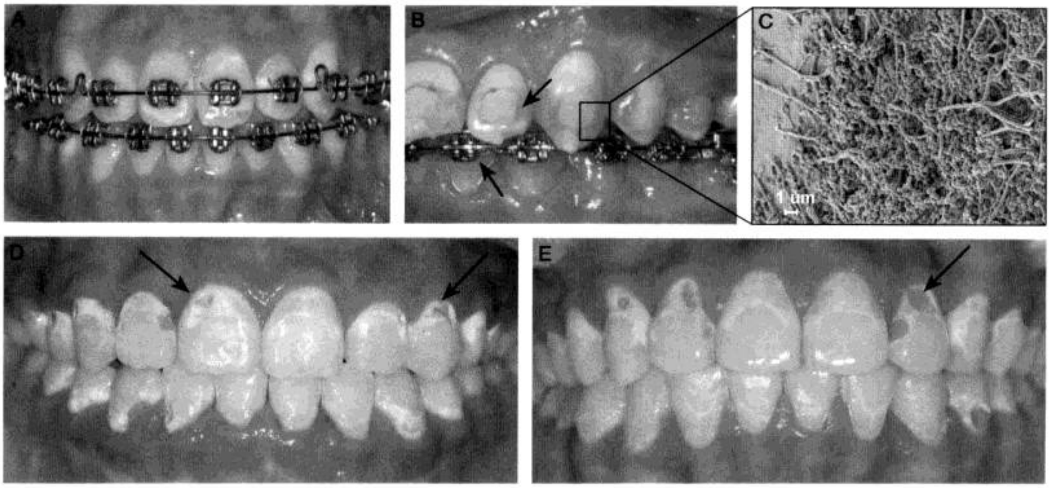


图 15-1　正畸固定矫治器妨碍口腔清洁和自洁（A）；导致牙齿表面和托槽周围容易黏附生物膜（B 染色，C 扫描电镜）；拆除固定矫治器后，托槽周围釉质脱矿、牙龈炎甚至龋洞（D、E）

固定正畸中正畸材料的复杂性和口腔环境的特殊性，决定了牙菌斑生物膜的复杂性和特殊性。根据口腔微生态理论，正常健康状态下，牙菌斑生物膜微生物群落与宿主保持着生态平衡；当环境或宿主的某些条件改变后，这种平衡被打破，牙菌斑生物膜微生态随之发生改变。正畸固定矫治器及各种正畸生物材料，如不锈钢托槽、树脂粘接剂、镍钛合金丝、橡皮结扎圈等，固定在牙齿上或置入口腔中后改变了口腔环境和口腔微生态平衡，牙菌斑生物膜微生态系中细菌与细菌之间的协同、竞争或拮抗作用被破坏。

各种正畸材料在唾液的浸泡下还会发生腐蚀现象，渗出 Ni^{2+}、Fe^{3+}、Cr^{3+} 等金属离子和化学物质，使得正畸中的口腔环境显著不同于正常的口腔环境，牙菌斑生物膜的微生物群落结构、组成、致病性也随之发生改变。用固定矫治器后，患者口腔局部环境发生改变，牙菌斑生物膜内杆菌数量明显多于球菌，生物膜致病性增强。有研究发现，正畸矫治器释放到口腔中的金属离子影响口腔细菌的致病因子，导致生物膜数量增加、致病性增强，且不同金属离子对致病因子的表达影响程度不同。

二、各种正畸矫治器对微生态和细菌黏附的影响

正畸固定矫治器粘接到牙齿上之后，刷牙、漱口等口腔清洁措施较矫治之前困难很多，牙面及托槽周围的软垢、生物膜显著增加，尤其是托槽龈缘附近牙面上的牙菌斑生物膜，容易刺激牙周组织导致牙龈炎。托槽边缘残留的粘接剂和磨牙带环边缘的水门汀粘接剂，其表面十分粗糙且不利于清洁，为口腔微生物提供了更多的沟窝点隙，这些特殊的正畸微环

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

境,使得正畸中的微生物分布发生变化。

（一）不同类型和材质的正畸托槽

粘接在牙面上的托槽是固定正畸治疗中细菌黏附和牙菌斑生物膜形成的主要影响因素。目前临床上应用的正畸托槽种类繁多,从设计类型上可以主要分为普通托槽和自锁托槽两类;从制造材质上可以主要分为不锈钢托槽、陶瓷托槽和塑料托槽三类。很多研究比较了普通托槽和自锁托槽表面细菌黏附和生物膜形成的情况,发现自锁托槽表面黏附的生物膜明显少于结扎圈结扎的普通托槽,但也有研究指出自锁托槽由于其设计厚度及复杂度,其黏附的细菌量并不少于结扎丝结扎的普通托槽。

各种不同材质的托槽本身,由于其表面处理工艺和化学组分不同,其表面黏附的细菌数量也不相同。表面张力越高的材质,黏附细菌的能力越强,丙烯酸树脂类与杜拉菲尔高强力黏胶纤维成分的矫治器最容易黏附唾液黏蛋白,导致更多细菌生物膜黏附和形成。塑料托槽周围牙釉质表面黏附的变异链球菌量高于普通金属托槽。金属托槽的菌斑清除率高于陶瓷托槽与塑料托槽,而中国产金属托槽菌斑清除率较进口金属托槽低,可能是由于表面工艺差异所致。在比较三种美学托槽的研究中,发现多聚甲醛、多聚乙烯和多聚碳酸酯三种材质制成的美学托槽对链球菌的黏附没有统计学差异,可能是因为树脂多聚体材质的材料有着相似的细菌增殖与菌斑黏附的特性。

（二）不同正畸粘接剂

玻璃离子粘接剂在细菌培养中可出现抑制区域,树脂加强型玻璃离子水门汀则表现出较强的抑菌活性,并且可持续一周。国内目前常用的正畸粘接材料是是复合树脂粘接剂(京津)、非调和型正畸粘接剂、玻璃离子水门汀粘接剂、光固化玻璃离子粘接剂、聚羧酸粘接剂等。

光固化玻璃离子粘接剂含有氟化物,能够在相当长的时间内释放氟离子,抑制了釉质脱矿,黏附细菌最少,且不需要酸蚀牙面就能与釉质形成化学结合,避免了酸蚀引起的牙面脱矿,其次为高黏度聚羧酸粘固剂和复合树脂牙釉质粘接剂。单纯从粘接强度出发,京津牙釉质粘接剂粘接强度最强,光固化玻璃离子次之,高黏度聚羧酸粘固剂的粘接强度最低。从细菌黏附的角度来看,光固化玻璃离子粘接剂黏附细菌最少,高黏度聚羧酸粘接剂次之,京津釉质粘接剂黏附细菌最多。

（三）不同结扎方式

在比较了正畸临床最常见的三种结扎方式——金属丝结扎、橡皮圈结扎和自锁托槽,发现结扎丝结扎的托槽黏附细菌最少,自锁托槽次之,橡皮结扎圈结扎的托槽黏附最多。以单个托槽结扎而言,结扎丝结扎的托槽与自锁托槽黏附的细菌均少于结扎圈结扎的托槽,在口内环境中,金属自锁托槽的菌斑黏附数量明显少于橡皮圈结扎的托槽生物膜黏附,这可能与自锁托槽无增加结扎附件且体积较小而更易清洁有关。

三、正畸矫治生态学问题的防治

（一）刷牙

刷牙是去除正畸治疗中生物膜最主要的方法。2010 年,Costa 等研究报道,尽管固定矫治器妨碍了口腔清洁,刷牙可以显著降低患者的龈上菌斑指数。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

1. 牙刷类型　现在市面上用于正畸患者的牙刷主要有普通牙刷、三头牙刷、正畸牙刷、电动牙刷、超声牙刷等，不同形态或类型的牙刷其清除正畸生物膜的效果不同。有研究发现正畸牙刷与普通牙刷在清除正畸生物膜的效率上并无明显差异。电动牙刷与普通牙刷的优劣上，一直存在着争议，一些研究认为电动牙刷和超声牙刷较普通手动牙刷在清除细菌生物膜、控制牙龈炎方面更为有效，但也有研究显示两种牙刷在清除生物膜效果上并无显著性差异。使用电动牙刷刷牙的患者托槽脱落率高于手动牙刷的患者，并建议正畸患者使用电动牙刷时要小心。

2. 刷牙方法　较之于牙刷的刷毛形状和动力来源，患者自身刷牙的次数、时间、正确的刷牙方法在去除细菌生物膜上更为重要。Bass 刷牙法是公认的能够清除龈沟内细菌的刷牙方法，因此建议患者使用 Bass 刷牙法。由于牙齿唇面或颊面被托槽、带环和弓丝分割成上下两个部分，建议应分两个步骤刷牙：第一步先清洁托槽近切缘的牙面和牙龈边缘等部位；第二步清洁托槽龈方牙面，并尽可能将牙刷的刷毛伸进托槽与弓丝之间，清除托槽近远中牙面上的菌斑，刷牙力量不宜过小。

（二）牙线、邻间刷

2010 年，Bock 等临床实验研究发现，牙齿的邻面缝隙、托槽附近容易堆积牙菌斑生物膜，仅靠刷牙难以完全去除，使用牙线和邻间刷可以有效地辅助清洁弓丝与牙面之间、托槽附近牙菌斑生物膜。Kossack 等发现连续使用邻间刷 1 个月后，可明显减少邻面菌斑指数和探诊出血，更为有效地减少生物膜、防治牙龈炎、维持正畸患者良好的口腔卫生。2012 年，Sharma 等研究发现，使用空气动力的牙缝清洁机可以减少牙面 57.5% 的菌斑量。因此，牙间刷和牙线均能有效减少附着于牙齿邻面的生物膜，但需根据患者邻间隙的大小，选择恰当的牙缝清洁器材，并在医生的指导下掌握正确的使用方法，以更有效地清除正畸过程中生物膜黏附。

（三）冲牙器

针对正畸患者的冲牙器采用口腔脉冲高压冲洗技术，以 400MPa 的高压水柱冲洗口腔，达到有效清除刷牙、牙线所无法触及的牙缝深处、牙龈以下和齿间部位的细菌生物膜，冲洗过程产生的脉冲水可以不断地按摩和刺激牙龈，从而促进牙龈的健康。

比较普通牙刷组、普通牙刷加牙线组、普通牙刷加冲牙器组清除正畸生物膜的效果，发现冲牙器可有效减少患者牙龈出血，效果好于普通牙刷组和普通牙刷加牙线组。此外，冲牙器与牙缝清洁机配合使用清除生物膜的效果优于单独使用冲牙器。

（四）牙膏及成分

近期大量的临床研究、系统评价和 Meta 分析发现，含氟牙膏可以减少正畸过程中生物膜的形成、降低患者的菌斑指数、减少牙齿脱矿和牙龈炎的发生率，且含氟量为 1500ppm 的牙膏防龋效果高于标准含氟量 1000ppm 的牙膏。2010 年，Al Mulla 建议使用含氟牙膏，刷牙指导（modified fluoride toothpaste technique，MFTT）以保持口腔内氟离子浓度，比单纯使用含氟牙膏更能有效防止脱矿及龋坏的发生。国内学者对雅皓乳膏研究发现，其主要成分是丁香酚和硼砂，丁香油有弱抑菌、杀菌及安抚作用，使用雅皓乳膏的固定正畸患者比使用一般含氟牙膏的患者牙龈指数与菌斑指数均有显著降低。Oltramari-Navarro 等的临床研究发现使用含有抑菌物质如四环素和三氯生共聚物的牙膏，或含有氟和银等离子生物活性的牙膏

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

均能在一定程度上减少正畸中生物膜所致牙龈炎的发生。

(五)漱口液及成分

含有氯己定、精油、抗生素、中草药等成分的漱口水可减少正畸中生物膜的形成,防治牙龈炎。2011 年,Prasanth 等体外研究发现,氯己定的抑菌效果优于含三氯生类抗菌剂的漱口水,但由于氯己定长期使用可能造成口腔黏膜变色,且味道偏苦,目前市面上出现了许多含其他药物的漱口液,如含有精油的 Listerine 漱口液。研究表明,含有精油的漱口液具有广泛的抗菌谱,能够渗透进入生物膜的深层,杀灭附着在牙面及矫治器上的细菌,起到抑制生物膜再生和减轻牙龈炎的作用,同时不造成口腔染色,也不影响味觉。还有添加抗生素、中草药的漱口液,如含没石子的西帕依固龈液可明显降低受试者的菌斑指数和龈沟出血指数。复方茶多酚含漱液在固定正畸治疗中,减少细菌生物膜预防牙龈炎的效果优于氯己定含漱液,且不宜产生耐药性。在使用含氟牙膏的基础上加用含氟漱口液,可以有效预防生物膜的形成和牙齿脱矿的发生,并促进脱矿部位的再矿化。

(六)正畸托槽和弓丝

通过改良托槽的材质、表面处理工艺、外形设计等方法减少生物膜的形成,如托槽或弓丝在生产制作的过程中,使用铸造工艺减少焊接形成的粗糙表面,并提高表面抛光处理,使得矫治器表面更加光滑流畅,减少了细菌可以藏身的沟窝。近年来兴起的自锁托槽使用自带的弹簧片替代了普通托槽的结扎装置,从而避免了额外的橡皮结扎圈或结扎丝结扎,使得患者相对更容易清洁矫治器周围牙面,不同程度上减少了生物膜的黏附和形成。另外,也有学者尝试将托槽改良,使其具有缓释氟的功能,并在体外实验研究中取得了初步成效。

(七)涂层技术

在正畸弓丝和托槽表面尝试通过添加各种涂层以控制正畸生物膜的形成,如银铂(Ag-Pt)合金涂层、TiO_2涂层、TiAg 涂层等。其原理是将纳米级无机抗菌剂涂在托槽表面,利用其超微结构形成的光滑的自洁面,减少唾液黏蛋白的黏附,以提高生物膜清除率。银合金可释放具有抗菌活性的银离子,TiO_2在紫外线下产生活性物质,杀灭致病菌,减少黏附与杀菌灭菌两方面降低生物膜的形成。在弓丝表面涂了 TiO_2/Ag 涂层之后的体外实验发现,含有 TiO_2/Ag 涂层的正畸弓丝其抗生物膜黏附效果优于没有涂层的普通弓丝。

(八)粘接剂

托槽周围残余的粘接剂表面比较粗糙,且固化之后与牙面之间会存在约 10μm 左右的微隙,加之此处有结扎丝与弓丝的阻挡,不易清洁和自洁,导致粘接剂表面非常容易黏附细菌生物膜。为更好控制粘接剂表面的生物膜,树脂加强型玻璃离子粘接剂表现出较强的抑菌活性,并且可持续一周。光固化玻璃离子不需牙面酸蚀,并含有氟化物,能够缓慢释放氟离子,对抑制生物膜和牙齿脱矿起到一定作用。也有研究报道,释氟抗菌型自酸蚀粘接系统 Clearfil Protect Bond 能有效抑制托槽周围的细菌黏附,减少正畸中牙面脱矿的发生。

(九)结扎方式、弓丝设计、附件选择

在临床最常用的三种结扎方式中,不锈钢结扎丝和自锁结扎方式均比橡皮结扎圈结扎所黏附的细菌少,所以从口腔卫生清洁这个角度来讲,最好使用自锁托槽或不锈钢结扎丝结扎托槽。自锁托槽结构的小巧性使得牙面的生物膜相对较少,受到正畸医生的青睐。Pellegrini 等发现橡皮结扎圈比自锁托槽更易黏附细菌生物膜,为更好地控制正畸中生物膜的形

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

成,对于口腔卫生较差的患者,一般不推荐使用橡皮圈结扎。

复杂的弓丝弯制或附件佩戴,不仅给患者的口腔清洁带来诸多不便,也为生物膜的黏附提供了更多的表面和可乘之机。正畸矫治设计时,应尽量简化矫治附件和弓丝曲的设计,在不影响矫治效果的前提下,尽量避免弯制过于复杂的矫治曲,减少不必要附件的粘接和佩戴,让患者更容易进行口腔清洁,维护口腔卫生。

(十) 定期口腔卫生洁治

对于龋齿或牙龈炎的易感人群,正畸过程中定期的牙周洁治是去除生物膜、预防和治疗牙齿脱矿和牙龈炎发生的重要措施之一。2011 年,Boyer 等发现,约 4% 的患者在正畸结束之后会出现牙龈退缩,牙龈附着丧失的比例明显高于非正畸治疗组。Boyer 通过对正畸结束后的患者长达 16 年的观察得出,牙周治疗能帮助患者保持牙槽骨的高度,故建议在正畸矫治开始及结束之后都常规进行牙周洁治,治疗期间医师可根据患者的口腔卫生情况定期让患者进行口腔卫生洁治术。

(十一) 口腔卫生宣教

正确的口腔卫生宣教,使患者养成良好的口腔卫生习惯,是控制正畸中生物膜的重要措施。正畸治疗前及治疗过程中教会患者清除细菌生物膜的方法,进行系统的口腔宣传教育,其牙龈指数与牙龈出血指数水平明显低于未宣教患者,可见正确的口腔宣教能帮助患者在正畸中保持良好的牙齿和牙龈健康。由于每个患者的成长背景、认知程度、对新知识的接受度等差异性以及口腔宣传教育者的知识背景不同,口腔宣教的效果参差不齐。

目前,控制正畸生物膜、保持良好口腔微生态的方法主要包括:①个人刷牙;②含抗菌剂的牙膏、漱口液,辅助牙齿清洁工具;③矫治器的设计和附件选择;④定期专业的口腔洁治;⑤各种方式的口腔宣教等措施。正畸医生应教给患者正确的刷牙方法,并根据情况指导其使用漱口水、邻间刷等辅助工具,并根据情况决定是否让患者使用药物牙膏、防脱矿或再矿化药物,甚至多种方法共同配合的综合措施,从而达到控制减少正畸中生物膜的黏附,维持良好健康的口腔微生态平衡,预防牙齿脱矿和牙龈炎等并发症的发生。

第三节　义齿修复的生态学

义齿修复是牙列缺损治疗的重要方法,义齿置入口腔中后,会导致口腔局部微环境改变,如桥体下方的唾液流量和流速相对减小,基托表面粗糙的沟窝为口腔微生物提供了更多的藏身之地和黏附表面,这些口腔环境的改变有利于微生物的生长,口腔微生物的数量和比例会发生变化,如果患者不能保持良好的口腔卫生和义齿清洁,则可能引起口腔微生态失衡,导致基牙龋坏、牙周炎、黏膜炎症等,是口腔修复学中亟待解决的临床问题。

一、活动义齿修复的生态学问题

患者戴用活动义齿之后,口腔微生物的数量和质量均会有所变化。口腔菌斑指数显著高于未戴义齿之前水平,即使患者按照过去早晚刷牙的口腔卫生习惯来清洁牙齿,余留牙上生物膜形成的量仍明显增多。临床观察发现,细菌生物膜主要集中于基牙与基托和卡环接触的牙面附近、卡环臂周围,并向外扩散至龈缘区域。不同设计类型的活动义齿,无论患者

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

戴用哪种义齿，余留牙上黏附的生物膜数量均增多，且生物膜的增加与义齿的佩戴具有直接相关性，但与义齿是否覆盖余留牙的舌面及覆盖的程度无明显相关性。Bergman 等指出，佩戴活动义齿会改变口腔微生态环境，增加牙面上生物膜黏附，增加了发生牙龈炎、牙周炎、龋齿的危险性。

患者戴用活动义齿后，唾液中变异链球菌比例明显增加，乳酸杆菌是否增加还众说不一。对活动义齿修复中基牙牙面上生物膜的研究发现，初期生物膜主要由球菌、短杆菌组成，并含有少量的梭形菌和螺旋体；随着戴用时间的延长，生物膜内出现丝状菌，螺旋体比例也有所增加，逐渐形成复杂的菌丛；随后梭形杆菌、丝状菌的增加趋于稳定，螺旋体持续增加，但此研究所观察的时间较短，对于长期戴用活动义齿对牙面生物膜组分的影响尚不十分清楚。有学者研究了患者戴用活动义齿 3 个月的情况，发现基牙表面生物膜中变异链球菌为优势菌，并在 3 个月内呈逐渐上升趋势，提示活动义齿可改变口腔微生态，促进某些条件致龋菌的黏附生长，增加基牙患龋的危险性。有学者比较了义齿不同区域的微生态，发现塑料基托承托区生物膜中链球菌、放线菌、乳杆菌、奈瑟菌、产黑色素普氏菌、念珠菌高于非承托区。不同材料的基托对口腔微生态影响也不同，有研究报道树脂基托引发义齿性口炎的发病率高于钴铬合金体铸造基托。

活动义齿可能通过以下机制改变口腔微生态。牙列缺损患者活动义齿修复之后，活动义齿的戴入会在不同程度上妨碍舌及口腔软组织在咀嚼过程中对牙齿的生理自洁作用，义齿和余留牙之间狭小的空间降低了局部唾液的流速和流量，唾液的冲刷作用减小，软垢、生物膜容易在此处黏附滞留。同时，滞留的食物残渣也为黏附在义齿表面和牙齿、黏膜表面的微生物提供了营养来源，为生物膜的生长代谢和成熟繁殖起到了促进作用。由于局部唾液冲洗作用减少，生物膜代谢产生的酸类和有害产物无法得到缓冲和稀释，于是患者牙龈炎、龋齿、口腔黏膜炎发生的危险性就显著增加。

但是，也有研究对比了戴用活动义齿和不戴用活动义齿的人群之间的患龋率，未发现两组之间有统计学差异，戴用活动义齿与未戴用活动义齿者的余留牙龋坏率、牙松动度、牙周袋深度、牙槽骨丧失情况等也未发现显著差异，认为活动义齿覆盖下的牙龈组织炎症可能是由于患者口腔卫生清洁不彻底所致。因此，虽然戴用活动义齿会改变局部口腔微生态，但尚无直接证据表明临床症状（如龋齿、牙龈炎）的加重与佩戴活动义齿有关。

二、全口义齿对口腔微生态的影响

牙萌出和牙列的缺失均会改变口腔微生态。牙萌出后，牙面黏附的微生物开始在口腔内定居；牙列丧失后，这些微生物相对减少。有研究发现，全牙列缺失患者以及佩戴全口义齿的患者，其口腔微生物的种类和数量均不同于正常牙列人群。

牙列缺失患者的口腔微生态会随着全口义齿的佩戴情况呈波动性变化。有研究报道，拔除所有残余牙变成无牙殆时，唾液腺分泌功能下降，口腔内的乳杆菌和酵母菌显著降低或消失，唾液链球菌有所增加。佩戴全口义齿 2 个星期后，唾液分泌功能可出现适应性改变，口腔内乳杆菌和酵母菌会逐渐回升，但相对于拔牙前仍处于较低的水平，唾液链球菌仍处于较高的水平。佩戴全口义齿3～5 个星期后，口腔内的乳杆菌和酵母菌有所增加，唾液链球菌逐渐降低至拔牙前的水平；如果暂停佩戴全口义齿 2 天，唾液中变异链球菌和血链球菌的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

含量显著减少甚至检测不到,唾液链球菌的含量未发生明显变化;重新恢复佩戴全口义齿2~4天后,又可以再次检测出血链球菌和变异链球菌。

全口义齿修复造成的口腔微生态改变,如果超出宿主代偿能力,则会导致口腔微生态失衡,引起义齿性口炎等疾病,尤其是在上颌全口义齿修复患者。细菌学研究发现,白假丝酵母菌是义齿性口炎的主要致病菌。扫描电镜观测发现,义齿性口炎患者的全口义齿表面生物膜厚度较厚,并有酵母菌存在,非义齿性口炎患者的全口义齿表面生物膜相对较薄,未发现酵母菌的存在。

三、固定义齿修复的生态学问题

正常情况下,口腔的温度、湿度、营养和各种解剖结构,为口腔微生物的黏附定植、生长繁殖提供了适宜的条件和微环境。700多种口腔微生物在口腔不同部位共栖、竞争和拮抗,它们与宿主的相互作用构成了口腔生态系,通过微生物之间的共生关系达到动态平衡,微生态的平衡与宿主口腔健康有着密切的关系。如果局部口腔微生态失衡,就有可能导致组织炎症反应。无论哪种义齿,作为口腔内的人工修复体,都必然不同程度地影响牙体缺损部位的清洁和自洁功能,并为口腔微生物的黏附提供更多的表面和机会。

固定修复中影响口腔生态系的因素主要包括宿主因素、细菌因素和环境因素。宿主因素,局部解剖结构、唾液分泌、口腔卫生、全身免疫、饮食习惯、药物使用等因素均可影响口腔微生态。保持良好的口腔卫生,可以阻止微生物在修复义齿表面黏附和聚集,有利于口腔健康。细菌因素,义齿表面或周围组织上已经形成的细菌生物膜,为某些对口腔组织或义齿材料黏附力较小的细菌进入口腔正常菌群或生物膜中定居提供了条件。环境因素,局部口腔微环境和固定义齿自身的理化特征也会影响口腔微生态。固定义齿一般由固位体、桥体和连接体三个主要部分组成,这三个部分的设计、结构、理化性质等均会影响到口腔微生态。

(一) 固位体

固定义齿的固位体边缘与牙龈直接接触,冠边缘位置、密合性、表面粗糙度或微渗漏、修复材料的不同理化性质等,都会直接影响到局部口腔微生态。固位体边缘设计通常包括龈缘以上、平齐龈缘和龈缘以下三种类型。全瓷冠边缘处于不同位置时龈沟液的酶活性,固位体边缘位于龈缘以下时酶活性提高,冠边缘对牙龈刺激大、龈沟液增多,龈沟内正常的微生态环境改变,而冠边缘平齐龈缘时酶活性无明显变化。冠边缘位于龈下时,牙龈的出血风险是龈上边缘的2倍,龈上边缘设计不会机械性刺激牙龈,有利于口腔清洁卫生和牙周组织健康。固位体边缘的密合性会影响到龈沟细菌黏附。龈下的边缘缝隙大小与牙周炎的严重程度成正相关。扫描电镜研究发现,尽管冠边缘缝隙由粘接剂占据,但其粗糙的表面和微渗漏仍为微生物提供藏身之处。

(二) 连接体

连接体的设计对患者的发音、美观、自洁等有重要影响,连接体龈方的邻间隙容易嵌塞滞留食物、牙垢、生物膜。邻间隙的乳头区被认为是连接体下最容易受损害的区域。如果固定修复时未能恢复邻间隙正常的解剖形态,则会影响局部唾液流量,降低口腔生理自洁作用,从而影响到局部的口腔微生态。所以,固定修复时,连接体应参考患者正常邻间隙的生

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

理形态设计，兼顾美观、发音、生理自洁等各方面因素。

（三）桥体

桥体的设计类型、材料理化性质、与牙槽嵴黏膜的适合性等会影响到口腔微生态。桥体材料不同、桥体与黏膜接触面积不同，桥体下生物膜的组成与数量也各不相同。桥体龈方与牙嵴顶黏膜间微小的缝隙，容易滞留软垢和食物残渣，该部位唾液流速缓慢、流量少，导致局部氧化还原电势和氧张力发生改变，导致微生物的种类和数量发生变化，口腔微生态平衡失调，导致口腔黏膜局部组织炎症。良好的口腔卫生，清除桥体表面黏附的细菌生物膜可防止桥体周围黏附炎症的发生。临床上，改良盖嵴式桥体自洁作用较好，舟底式桥体在三角间隙处易滞留食物。通常情况下，桥体龈端与黏膜的接触面积越小，越不易滞留食物残渣，牙龈炎症就越轻，修复失败率越低。

（四）修复材料

体外比较不同修复材料后发现，烤瓷和复合树脂上细菌黏附较金合金表面少，且细菌黏附力低。同时，烤瓷材料容易清洁，生物膜和软垢停留较少，所以固定修复时可增加烤瓷面积，以减少生物膜的黏附。贵金属烤瓷冠修复前后的口腔微生态，冠修复会改变局部口腔微生态，牙体预备后消化链球菌和梭杆菌在短期内明显增加，3 个月后恢复到备牙前水平。贵金属具有良好的生物相容性和光洁的材料表面，使得口腔微生态可以在较短的时间内恢复到备牙前水平。牙体预备前可以检测到的二氧化碳嗜纤维菌，贵金属冠固定修复 1 年内均无检出，这可能与贵金属的某些成分对二氧化碳嗜纤维菌的生长具有抑制作用或口腔微生态的重新调整有关。

四、义齿修复中微生态学问题的防治

（一）活动义齿修复中微生态学问题的防治

尽管活动义齿修复相对于固定义齿修复，可以为患者提供更方便的口腔清洁和义齿清洁措施，但临床上佩戴活动义齿的患者，其口腔微生态失衡及相关疾病问题仍无法完全消除，活动义齿修复中微生态问题的防治不容忽视。所以，良好的义齿设计和制作、抗菌材料的选择、定期的义齿检查和维护等，对于平衡的口腔微生态和长期健康的活动义齿修复具有重要意义。

1. 活动义齿设计和制作　为尽量减少生物膜黏附，活动义齿的各个部件，包括卡环、支托、连接体、基托等，都应尽可能简单实用，减少不必要的结构设计。在不影响义齿强度和舒适性的前提下，基托连接体的设计应尽量远离龈缘，以利于清洁和自洁。义齿制作时，各部件结构表面应尽量抛光，降低粗糙度，减少微生物的藏身之地，避免引起口腔微生态失衡的不利因素。虽然瓷表面上釉并不能阻止微生物黏附，但完整光滑的釉层有利于生物膜的清除。

2. 抗菌修复材料　将氟化物控释系统嵌于活动义齿基托中，使氟化物缓释入口腔，以防治基牙早期龋损和促进再矿化的发生。将异丁烯酸加入到 PMMA 中形成的共聚体带有负电荷，可以减少基托表面白假丝酵母菌的黏附。在基托表面镀一层纳米非晶金刚石涂层，使基托表面更加平整光滑，可以减少义齿基托表面链球菌和白假丝酵母菌黏附，将季铵盐类化合物、甲壳胺纤维、氟化钙、二氧化钛、氧化锌、载银抗菌剂等加入到义齿基托中，增强抗

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

菌性。

3. 义齿性口炎的治疗　对于义齿性口炎的防治，目前仍缺乏有效的临床方法。有学者曾尝试使用念珠菌抗体治疗义齿性口炎，发现当抗体浓度达到一定水平时，可以治疗Ⅱ和Ⅲ型义齿性口炎，对Ⅰ型口炎治疗效果不佳。也有学者利用从人初乳中提取的sIgA抗体，用于阻止白假丝酵母菌与口腔黏膜上皮的黏附。

4. 生态防治　生态防治包括去除义齿本身引起微生态失衡的病理因素，如不良的解剖结构。通过体育锻炼，提高自身免疫系统功能，增强抵抗疾病的能力。设法降低致病菌和潜在致病菌与义齿和组织的黏附，维持正常微生物群的定居和平衡。

5. 正确的口腔卫生宣教，定期的义齿检查和维护。多数患者在初期佩戴活动义齿时均能保持良好的卫生清洁，随着时间的延长，警惕性逐渐降低，口腔卫生和义齿清洁变差，最好要求患者应定期复查和维护，保持义齿的长期功能和健康卫生。修复医师应帮助患者理解保持口腔及义齿清洁的临床意义，教会患者正确的口腔卫生习惯，提醒患者尤其注意与活动义齿接触的邻牙的清洁卫生，尽量使用含氟牙膏和抗菌漱口液。此外，也可以选用含有抗菌药物的义齿清洁剂冲洗义齿，其抗菌效果明显好于单纯用清水冲洗。同时，在修复前，应对口腔内余留牙进行系统的洁治，消除既有的牙龈炎、牙周炎、龋齿等问题，使患者口腔维持健康水平。

（二）固定义齿修复中微生态问题的防治

为更好地防治固定义齿修复中所面临的微生态学问题，患者应保持良好的口腔卫生习惯和义齿清洁措施，修复医生应科学地进行义齿设计，选择精良的修复材料和制作工艺，共同维护口腔微生态平衡和义齿修复健康。

1. 良好的口腔卫生和义齿清洁　义齿修复后，良好的口腔卫生习惯和定期的义齿清洁是维持健康口腔微生态的关键。手动牙刷或电动牙刷配以含氟牙膏，机械性清除表面黏附的生物膜；使用含抗菌剂的漱口液漱口和清洁义齿；超声波洁治义齿表面和牙齿表面的生物膜、软垢和牙石，但操作时应轻柔，避免在修复体表面产生划痕，增加修复体表面粗糙度。定期的复查和科学的口腔卫生宣教对于义齿修复健康的维护也是十分必要的。

2. 在固定义齿设计时，应兼顾功能、美观、易清洁等综合因素，尽量避免悬突和不必要的外展隙，减少软垢和细菌生物膜的黏附集聚。通常情况下，如果桥体外形过突，会减少咀嚼时食物的自洁作用，增加生物膜黏附。有研究比较了不同桥体类型的清洁情况，发现鞍式桥体虽然外形较好，但其龈端与黏膜的接触面积大，容易滞留食物和软垢，不利于口腔组织的健康。盖嵴型桥体的自洁作用较鞍式桥体稍好，但局部清洁仍受牙槽嵴形态的影响。改良式盖嵴型桥体的自洁作用有所提高，但其舌侧易嵌塞食物不易清除。舟底型桥体是口腔清洁相对比较良好的设计，它不仅具有良好的外观形态，而且口腔自洁作用也较其他几类有所改善。

3. 固定义齿的材料选择和制作工艺直接影响到义齿修复的口腔健康。生物相容性好、抗溶解、耐腐蚀的生物材料，对口腔微生态影响相对较小，远期修复效果好。例如，陶瓷材料密度相对较高，表面光滑，抗溶解、抗腐蚀性较好；树脂材料一般会有单体残留，易形成气泡和沟痕，表面相对较粗糙；金属材料一般容易被口腔内的潮湿环境溶解腐蚀，渗出金属离子，表面变得粗糙，腐蚀的产物还可能与生物膜及其代谢产物共同作用，刺激局部黏膜发生

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

炎症。

通过扫描电镜对固定桥不同区域的生物膜黏附情况观察分析发现，树脂和金属粗糙的表面生物膜较厚，不易去净，陶瓷表面相对较光洁，生物膜黏附较少。将修复体表面黏附生物膜的能力由低到高排序为：陶瓷<钴铬合金<钛合金<金钯合金<金铂合金<甲基丙烯酸甲酯。因此，从口腔微生态的角度来讲，在修复临床治疗中应尽量提高制作工艺，减少材料表面的气泡、划痕，增加表面光洁度，并尽量采用陶瓷材料修复，以最大程度减少义齿表面和周围的生物膜形成。

第四节　种植义齿修复的生态学

种植修复已成为牙缺失患者的主要选择之一，同时种植修复技术也不断成熟完善，因手术操作或植入设计不当引起的种植失败已逐渐降低，因口腔微生态失衡导致的种植体周围炎成为种植修复失败的重要原因之一。

一、种植体周围微生物及生态学问题

牙科种植体置入口腔后，组织细胞和口腔微生物竞争性地黏附于种植体表面，如果宿主组织细胞首先占据并黏附于种植体表面，完整的组织细胞结构及宿主的防御功能便可抵抗口腔微生物的黏附和定植；但如果微生物先于组织细胞黏附于种植体表面，形成生物膜，则组织细胞将很难取代细菌与种植体表面结合，黏附的生物膜代谢产生毒力因子，可导致种植体周围炎，威胁到骨整合的成功性，这就是种植体表面组织细胞与口腔微生物之间的“表面竞争”(race of surface)。所以，种植体周围的微生态对于种植手术的成功性具有重要意义。

种植体周围炎与口腔微生态密切相关，从口腔微生态的角度来讲，种植体周围炎属于菌群失调性疾病。临床上发现，健康的无牙患者在种植修复之后，种植体表面不久便出现生物膜黏附，主要集在种植体与穿龈基桩的界面、穿龈基桩与上部结构的界面、种植体与修复体界面等部位。所黏附的生物膜厚薄不均、形态多样，其中50%以上为革兰阳性球菌、17%为兼性厌氧球菌、7%为革兰阴性厌氧杆菌。

尽管种植体表面有生物膜的黏附，但在健康状态下微生态处于平衡态，不会发生种植体周围炎症。当宿主免疫力降低，种植体受到机械损伤或理化刺激等因素时，牙龈卟啉单胞菌、伴放线杆菌、中间普氏菌、革兰阴性等可疑致病菌增多，牙周有益菌(如链球菌)减少，导致牙周微生态失衡，同时龈沟中的氧浓度的下降会形成局部缺氧环境，造成氧化还原电势下降，促进革兰阴性厌氧菌的进一步黏附聚集。局部组织炎症会造成龈沟液增加，在种植体周围形成富含氮和营养的微环境，为其他不发酵糖革兰阴性厌氧菌提供了生长繁殖所需的营养物质和金属离子等。

细菌相互黏附聚集、生长繁殖，革兰阴性厌氧杆菌和革兰阳性兼性厌氧球菌比例失调，生物膜毒力和致病性显著增强，毒力因子破坏种植体与组织的结合和生物屏障，微生物代谢产生的各种毒素进入组织内部导致种植体周围组织发生炎症反应，此时机体组织也会有自我防御和修复，但当微生物对周围组织的破坏超过了宿主的代偿修复能力时，就会导致种植体周围炎。临床通常表现为种植体周围黏膜发炎、黏膜炎性增生、脓肿、瘘管等，如果未能及

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

时治疗，炎症进一步发展，会导致种植体周围骨组织的丧失，种植体松动脱落，种植失败。

种植体植入口腔之后，种植体周围炎的发生与牙周致病菌有关。生物膜的厚度和分布范围与口腔菌斑的多少有一定的相关性。目前认为，导致种植体周围炎的主要可疑致病菌包括牙龈卟啉单胞菌（Pg）、中间型普氏菌（Pi）、具核梭杆菌（Fn）、伴放线杆菌、福赛拟杆菌和螺旋体等。Pg、Pi、Fn 等革兰阴性厌氧杆菌可分解龈沟液中的蛋白质，代谢产生的碱性产物会导致局部环境 pH 值的升高，抑制在中性或偏酸环境中生长的革兰阳性兼性厌氧球菌，导致种植体周围微环境中菌群失调。

对发生种植体周围炎的微生物标本进行培养后发现，40% 以上为革兰阴性杆菌，兼性厌氧杆菌和梭形杆菌明显增多，有螺旋体存在。对失败种植体龈下生物膜进行培养发现，50% 为革兰阴性杆菌，其中 10.4% 核梭杆菌、8.5% 为中间普氏菌、6.5% 为牙龈卟啉单胞菌、5.6% 为螺旋体。

二、种植体对微生态的影响

口腔环境是一个由 700 余种微生物构成的复杂微生态系统。种植体植入前，健康机体的口腔微生态均处于平衡状态，有益菌与有害菌共存，同时有益菌对有害菌产生抑制和拮抗作用。

种植体植入后，其周围微生物群落会发生动态变化。在无菌种植手术操作下，种植体植入时龈沟内并无细菌存在，但种植体的植入改变了口腔局部微环境，为微生物的黏附提供了更多的表面和机会。研究发现，种植体植入口腔中 30 分钟后即会有微生物黏附于其表面，如链球菌和放线菌。随着时间的延长，唾液、黏膜、牙齿、龈沟内的细菌会继续迁移，种植体龈下牙周细菌会逐渐增多，直到整个口腔内的微生物环境达到新的平衡状态。但种植体表面黏附定植的微生物与天然牙表面的微生物种类和数量会有所不同。

通常情况下，健康种植体周围微生态中主要为球菌，厌氧菌和需氧菌较少，牙周致病菌很少检测到。血链球菌和小韦荣菌是种植体龈沟环境中的有益菌群，对种植体周围可疑致病菌如牙龈卟啉单胞菌（Pg）、中间普氏菌（Pi）等具有抑制或拮抗作用。例如，链球菌产生的血链素能抑制可疑致病菌的生长，其内源性 H_2O_2 还可能参与破坏致病菌的细胞壁，从而抑制或拮抗致病菌活动。而在发生炎症的种植体周围可发现大量的伴放线菌聚集杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌，随着炎症发展，球菌构成比例下降，杆菌及螺旋体比例会上升。在这些早期黏附菌中，除了伴放线菌聚集杆菌和牙龈卟啉单胞菌两种重要的牙周致病菌未检测到以外，其余可疑牙周致病菌均有发现。

种植体表面不同的理化性质会影响口腔微生态和生物膜形成。①种植材料的种类：有研究发现细菌在羟基磷灰石表面的数量多于纯钛表面，多于钛合金表面；②种植体表面粗糙度：通常情况下，表面光洁的种植体黏附的细菌数量少于表面粗糙的种植体，在临床应用中，种植体颈部应高度抛光，尽量减少不规则沟纹；③口内余留牙情况：部分种植义齿种植体表面的生物膜附着明显高于全口种植义齿修复，有牙周病史的患者种植体周牙周致病菌高于普通患者，且牙周病的严重程度对种植体周细菌组成也有影响；④种植体不同设计形式：电镜发现不同部件之间缝隙的大小与生物膜的黏附有很大的关系，粘接固位基台周围检测出的微生物明显少于螺栓固位基台；⑤其他因素：唾液中的纤维结合素能黏附到细菌表面降低

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

链球菌黏附，患者的口腔清洁措施、吸烟等不良口腔习惯也会影响种植体表面的细菌黏附定植。

三、种植体生态学问题的防治

目前，种植体周围炎的防治问题仍然是种植修复学上面临的难题之一。临床上常用的种植体材料一般具有一定程度的抗菌性能，所含的金属离子钛、金、钴、钒、铝、铬等，这些金属离子表面氧化层中的氧分子可扩散并打破龈沟的厌氧微环境，降低局部微环境的 pH 值，抑制部分细菌代谢所需的酶，在一定程度上抑制致病菌的生长，如牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、伴放线菌聚集杆菌、具核梭杆菌、中间普氏菌等。种植体本身金属离子的抗菌性能无法完全消除种植体周围炎的发生，为此很多学者对种植体材料进行表面处理或改性，以进一步减少种植体表面致病菌的黏附，更好地控制种植体周围炎的发生，提高种植成功率。

种植体周围炎重在预防，但是，如果一旦炎症发生，可以利用各种物理、化学或综合措施控制清除炎症，促进种植体与周围支持组织的再生和再结合。本文主要从口腔微生态的角度对种植体周围炎相关的防治进行阐述。

（一）清创刮治

传统的清创和刮治可以机械性地去除生物膜，净化局部微环境，打破不平衡的微生态环境，促进组织细胞和微生态重新实现新的平衡状态。值得注意的是，金属刮匙和超声洁治探头有可能会刻损种植体表面，使得表面更加粗糙，但也有学者推测粗糙的种植体表面更容易使血块凝集附着，有利于新骨的形成和成熟。

喷砂技术在清除生物膜时虽然不会刻损种植体表面，但容易并发皮下气肿。一般机械清除生物膜可有效地消退炎症，不能显著增加骨再结合。

（二）抗菌抗炎剂

严格的无菌操作和术前、术后使用抗生素，可降低种植体周围炎发生率。局部使用抗炎制剂，也可降低微生物和机体产生的蛋白酶所引起的牙周组织破坏。碳纤维头超声洁治和局部使用 25% 甲硝唑凝胶可有效治疗种植体周围炎。枸橼酸和三氯生合用可选择性抑制种植体周围炎致病菌，且不影响正常健康牙体表面的链球菌和牙周正常菌群的生长。氯己定和生理盐水处理种植体表面后，种植体表面会有一定量的新骨形成和再结合。地莫西醇在种植体表面形成的膜状物会影响骨的再结合，氯己定也可能会形成类似的药物薄膜。

一些局部药物缓控装置如凝胶剂、微粒体、多聚纤维等，甲硝唑、氯己定、四环素、米诺环素等抗生素被应用到缓控装置。局部使用抗菌制剂虽然可以改善种植体周围的炎症反应，药物治疗并不适合所有患者，局部药物无法达到种植体袋的较深的部位。另外，不合理的使用抗生素也会导致细菌耐药和菌群失调。

（三）激光

Er：YAG 激光在短脉冲 10～30Hz 频率时可有效去除钛种植体表面的生物膜，并融化牙结石，探诊出血指数方面其治疗效果好于碳纤维超声洁治辅以盐酸米诺环素软膏。CO_2 激光在 4～7W 的范围和 20～80Hz 的频率时，可清除种植体表面感染。GaAIAs 二极管激光和 Nd：YAG 激光也可有效清除种植体表面的细菌。激光治疗只能清除种植体表面生物膜和污染物，在短期内减轻种植体周围的炎症反应，对骨缺损的再生修复和骨结合帮助有限。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（四）生态防治

乳杆菌代谢产物可能对种植体周围龈下致病菌具有一定抑制作用，并促进有益菌的发展以达到菌群平衡的目的。利用失去致病能力的病原菌突变株或正常菌样的有益菌作为效应株，植入口腔以取代或控制致病菌株来达到预防和控制感染的目的。

（五）抗菌涂层技术

为了提高种植体的抗菌特性，很多学者尝试通过各种途径将种植材料表面进行改性处理，通过改变种植体表面的理化性能，控制或减少致病微生物的黏附，这些涂层技术包括氮化涂层、二氧化钛涂层、银改性涂层、生物活性分子涂层等。

1. 氮化涂层　通过物理气相沉积或等离子注入等技术可以在种植体表面形成氮化涂层（如 TiN、ZrN），氮化涂层可明显降低纯钛表面的细菌黏附。TiN 和 ZrN 涂层是否能够抑制细菌代谢活性目前尚不十分清楚。

2. 二氧化钛涂层　TiO_2可通过光生电子和光生空穴作用直接与细胞发生反应，或先与水中的溶解氧反应，产生自由基等活性氧，再与细胞发生反应，杀灭细菌。有研究发现，具有纳米 TiO_2涂层的钛合金种植体材料，对 Pg、金黄色葡萄球菌、血链球菌具有较好的抗菌效果。

3. 银改性涂层　采用离子动态混合法或气相沉积法，可以在钛表面制备银抗菌层，有效减少 Pg 和 Aa 的黏附。银离子还可破坏微生物酶功能、阻碍呼吸作用、干扰 DNA 结合，杀死细菌。银离子也可通过光催化反应产生活性氧离子破坏细菌的增殖能力而杀菌。通过在羟基磷灰石涂层中载入 Ag^+，减少细菌黏附和生物膜的形成。高浓度的 Ag^+也会影响人体正常细胞的代谢功能，严重者还会患银质沉着病等。

4. 生物活性分子涂层　将甲基丙烯酸多聚物制备于钛表面，并在此基础上添加精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸（RGD）多肽等活性分子后，显著降低金黄色葡萄球菌的黏附，且没有发现影响成骨细胞功能。万古霉素分子共价修饰于钛表面形成万古霉素-钛抗菌涂层，可抑制种植体表面生物膜的黏附和形成，其抗菌活性可保持 1 年左右。

目前，种植体材料表面抗菌涂层研究进展迅速，各种新材料、新处理方法不断出现，但需要注意的是，口腔种植体表面始终有一层获得性唾液膜覆盖，这些涂层能否透过获得性膜发挥作用尚不确定，且种植体长期存在于体内，各种涂层的长期稳定性和生物安全性仍需要进一步的深入研究。

第五节　复合树脂与牙科粘接系统的生态学

随着现代牙科保存与美容修复需求的不断增长，复合树脂和牙科粘接系统在临床的应用也日益广泛。因口腔微生态失衡导致的继发龋已成为牙体修复失败的重要原因之一。

一、复合树脂与牙科粘接系统生态学问题

复合树脂于 20 世纪 60 年代出现，是在丙烯酸酯基础上发展起来的，是一类由有机树脂基质和经过表面处理的无机填料及引发系统组合而成的修复材料。复合树脂因其具有良好的美观效果、稳定的生物性能、操作性强等优点，是目前临床上应用最多的牙科修复材料。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

各种类型的复合树脂也是层出不穷，从最初的基于 Bis-GMA（双酚 A 甲基丙烯酸缩水甘油酯）的复合树脂，到现在的含有多种 Bis-GMA 衍生体系的复合树脂；从自体固化体系到现在的可见光固化体系；从大颗粒填料到微填充材料再到现在的纳米级填料的复合树脂；从传统复合树脂到现在的流动树脂、可压缩树脂、自体粘接流动树脂。

随着修复材料和技术的发展，牙体修复术中对牙体的保存也越来越重视，牙科粘接系统在其中起着举足轻重的作用。现代的牙科粘接剂大多数可以粘接各种修复材料，如复合树脂的直接充填、嵌体、贴面的粘接及牙齿过敏区域的封闭脱敏治疗等。牙齿的粘接可以分为釉质粘接和牙本质粘接，目前釉质粘接技术已经相对成熟。由于牙本质的特殊结构，牙本质粘接一直是研究和关注的热点。目前，牙体修复（尤其是复合树脂修复）的失败率居高不下。临床研究表明，继发龋和充填修复体折裂是目前复合树脂充填修复失败两个主要的原因。复合树脂修复体边缘牙菌斑中变异链球菌的比例远高于银汞合金和玻璃离子修复体。因此，牙体修复后对牙菌斑微生态的改变是影响继发龋发生的主要原因。

二、复合树脂与牙科粘接系统对微生态的影响

复合树脂主要通过牙科粘接系统与牙体组织粘接。牙体修复前需要去除龋坏组织，进行窝洞预备。窝洞预备后，牙体组织中仍然会残留有细菌，尤其是在牙本质小管中；此外，牙体修复后细菌也可能通过微渗漏进入到牙体组织-修复体交界面。复合树脂主要成分为无机填料与树脂基质，牙科粘接系统主要由酸蚀、底漆和粘接剂等组成。

目前认为临床常用的复合树脂和牙科粘接材料并不具有显著的抑菌作用，日常的口腔卫生保健对牙体组织-修复体交界面也难以起到有效的抑菌作用。临床上在牙体修复中也使用一些窝洞消毒剂，但是由于这些消毒剂作用时间较短，无法发挥长效抑菌或者杀菌作用，尤其是对于通过牙体修复后通过微渗漏进入的细菌。研究证实窝洞消毒剂的使用可能会影响到牙科粘接系统的粘接强度。复合树脂相对于银汞合金、玻璃离子等修复材料更容易造成牙菌斑生物膜的生长，而且牙菌斑中与龋病发生相关的细菌（如变异链球菌）的比例显著增加。因此，复合树脂与牙科粘接系统容易改变牙菌斑微生态，导致继发龋发生风险的增加。

三、复合树脂粘接修复的生态防治

提高复合树脂与牙科粘接系统的抑菌作用、降低牙菌斑生物膜微生态的致龋性是目前降低牙体修复失败的重要途径。在复合树脂和牙科粘接系统中加入纳米抗菌成分已经成为国内外牙科防龋材料研究的热点之一。根据作用机制，可将加入的纳米抗菌成分分为释放型和非释放型。

（一）释放型纳米抗菌成分

1. 纳米氟化物　氟化物目前在龋病的防治中应用广泛。氟可以抑制牙体硬组织的脱矿，促进牙体硬组织再矿化，干扰牙菌斑生物膜的形成，抑制微生物的生长与代谢，具有一定的抗菌作用。因此，前期研究已将氟化物加入到各种牙科材料，如玻璃离子、树脂改良玻璃离子、复合树脂等，通过氟离子的释放发挥防龋作用。

2. 氯己定　氯己定是一种表面活性剂，具有较强的广谱抑菌、杀菌作用。氯己定可以

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

吸附在细菌胞质膜的渗透屏障,使胞内物质漏出,低浓度时呈抑菌作用,高浓度时则呈杀菌作用。前期已有不少研究将氯己定加入到牙科材料中,如玻璃离子、复合树脂等,通过氯己定的释放发挥其抗菌作用。平均直径为620nm的氯己定颗粒加入纳米无定形磷酸钙复合树脂和纳米 CaF_2 复合树脂中,对变异链球菌生物膜生长和乳酸代谢有显著的抑制作用,比临床使用的商品化复合树脂要强10~20倍。

3. 纳米银　银离子是一种应用广泛的广谱抗菌剂。目前认为银离子可以使细菌一些重要的酶失活,阻止细菌DNA的复制,从而发挥抗菌作用。1~100nm的纳米银对革兰阴性细菌有良好的抗菌作用,并且1~10nm的纳米银具有直接接触杀菌作用。目前认为载银纳米抗菌材料的抗菌机制和无机银的抗菌机制类似,主要依靠银的强抗菌活性。

载银抗菌剂对常见的口腔致病菌有高效的抑菌作用。含有银的复合树脂能够抑制变异链球菌的生长,并且具有长效的抗菌效果,而加入纳米银的复合树脂的抗菌作用更强,并且抗菌作用随着纳米银的质量分数的增加而增强。将纳米银加入到牙科粘接系统中,能有效杀灭牙本质小管中的浮游细菌,粘接系统光固化后能抑制牙菌斑的生长和代谢,有效降低牙菌斑生物膜微生态系的致龋性。

(二) 非释放型纳米抗菌成分

目前,加入复合树脂的非释放型纳米抗菌材料主要是季铵类的化学物。季铵类化合物具有广谱抗菌性,对真菌、病毒等也有一定的抑制作用。加入复合树脂的季铵盐主要有甲基丙烯酰氧十二烷基溴吡啶(12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide, MDPB)、聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)和季铵二甲基丙烯酸(quaternary ammonium dimethacrylate, QADM)等。由于季铵类化合物带有正电荷,通过与细菌细胞壁的接触,扰乱带负电荷的细菌细胞膜起到杀菌作用,季铵盐抑菌机制可能是细胞死亡系统的激发因子。

1. 甲基丙烯酰氧十二烷基溴吡啶(12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide, MDPB)　MDPB是在牙科材料领域研究较早的一种季铵盐抗菌材料。Imazato等通过最小杀菌浓度、时间杀菌动力学的测量,发现MDPB具有良好的杀菌效果,对7种链球菌的最低杀菌浓度范围在31.1~62.5μg/ml之间,在250μg/ml具有快速杀菌作用。复合树脂中加入0.1~0.2w/w%的MDPB,能有效抑制变异链球菌黏附与生长,经过90天的浸泡处理后,该树脂仍保持良好的抗菌性能。复合树脂中加入2.83w/w%的MDPB,通过对人工根面继发龋作用的研究发现,该种树脂可以抑制龋损的发展,并且与粘接剂是否含MDPB无关。MDPB加入牙科粘接系统也被大量实验证实具有有效抑制龋病发生相关细菌的作用,目前含有MDPB抗菌成分的粘接系统已经成功商品化应用于牙科临床中。

2. 聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)　复合树脂中加入质量分数为1w/w%的PEI对变异链球菌有显著的抑制作用。1个月的长效实验证实,加入复合树脂中的PEI无明显析出,表明PEI能稳定地存在于复合树脂中发挥长效的抑菌作用。3个月的长效体外实验证实添加1w/w% PEI的复合树脂对变异链球菌有较强的持续的抗菌活性,同时PEI的烃基链长对其抗菌作用有着重要的影响。

3. 季铵二甲基丙烯酸(quaternary ammonium dimethacrylate, QADM)　QADM是一种含有2个甲基丙烯酸反应基团的季铵类化合物,因此QADM能与复合树脂基质中的Bis-GMA/TEGMA交联,形成网状结构。在纳米复合树脂和牙本质粘接系统中加入QADM,能有效抑

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

制变异链球菌生物膜和唾液来源的牙菌斑生物膜微生态系的生长和代谢。

复合树脂对生物膜的抑制作用随着 QADM 质量分数的增加而加强。其中纳米复合树脂对单菌种生物膜的抑制作用与 QADM 的质量分数呈显著的线性关系。长效实验证实，6～12 个月的老化测试并没有显著降低含有 QADM 的纳米复合树脂对变异链球菌生物膜的抑制作用，证明 QADM 能稳定地存在于复合树脂中，通过非释放"接触式"抑制作用降低牙菌斑生物膜致龋性。

（三）释放型和非释放型纳米抗菌成分联合使用

将释放型的纳米银和非释放型的季铵盐二甲基丙烯酸同时加入到纳米复合树脂和牙科粘接系统中，对牙菌斑生物膜微生态系的抑制作用相对于单独加入一种抗菌剂显著增强。另一方面，同时加入两种不同类型纳米抗菌剂后，复合树脂和牙科粘接系统的机械性能和临床使用的商品化复合树脂比较无显著差异。

（梅李　程磊　徐华焜）

参 考 文 献

1. 刘得玺，周鑫才，曹颖光. 种植体周围炎的治疗. 临床口腔医学杂志，2012，28：246-248
2. 刘惠颖，马国武. 种植体周围炎的微生态研究进展. 中国微生态学杂志，2005，17：158-159
3. 刘劲松，高宁. 细菌在牙种植体表面的定植及影响因素. 国外医学口腔医学分册，2004，31：121-124
4. 司家文，胡启凡，孙惠强. 种植体表面抗菌涂层技术. 口腔颌面修复学杂志，2011，12：119-122
5. 苏荷辉，肖晓蓉. 戴用可摘义齿的微生态学问题. 中国微生态学杂志，2000，12：120-123
6. 王珏，焦艳军. 种植体周围炎的微生物学研究. 中国口腔种植学杂志，2008，13：44-46
7. 汪振华，王金玉，袁祥民. 固定桥对口腔微生态系影响的研究现状. 国外医学口腔医学分册，2005，32：159-163
8. Al Mulla AH，Kharsa SA，Birkhed D. Modified fluoride toothpaste technique reduces caries in orthodontic patients：A longitudinal，randomized clinical trial. Am J Orthod Dentofacial Orthop，2010，138：285-291
9. Bock NC，von Bremen J，Kraft M，et al. Plaque control effectiveness and handling of interdental brushes during multibracket treatment-a randomized clinical trial. Eur J Orthod，2010，32：408-413
10. Chun MJ，Shim E，Kho EH，et al. Surface modification of orthodontic wires with photocatalytic titanium oxide for its antiadherent and antibacterial properties. Angle Orthod，2007，77：483-488
11. Deacon SA，Glenny AM，Deery C，et al. Different powered toothbrushes for plaque control and gingival health. Cochrane Database Syst Rev，2010，CD004971
12. Enaia M，Bock N，Ruf S. White-spot lesions during multibracket appliance treatment：A challenge for clinical excellence. Am J Orthod Dentofacial Orthop，2011，140：e17-24
13. Garcez AS，Suzuki SS，Ribeiro MS，et al. Biofilm retention by 3 methods of ligation on orthodontic brackets：a microbiologic and optical coherence tomography analysis. Am J Orthod Dentofacial Orthop，2011，140：193-198
14. Hickman J，Millett DT，Sander L，et al. Powered vs manual tooth brushing in fixed appliance patients：a short term randomized clinical trial. Angle Orthod，2002，72：135-140
15. Mei L，Busscher HJ，van der Mei HC，et al. Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. Dent Mater，2011，27：770-778
16. Mei L，Busscher HJ，van der Mei HC，et al. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. Eur J Oral Sci，2009，117：419-426
17. Pellegrini P，Sauerwein R，Finlayson T，et al. Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brack-

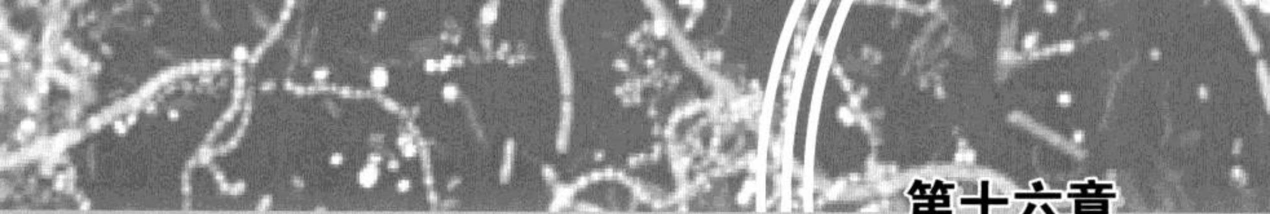
公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

ets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2009, 135: 426-427

18. Tufekci E, Dixon JS, Gunsolley JC, et al. Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. Angle Orthod, 2011, 81: 206-210

19. Yee R, Holmgren C, Mulder J, et al. Efficacy of Silver Diamine Fluoride for Arresting Caries Treatment. J Dent Res, 2009, 88: 644-647

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注



第十六章 口腔感染性疾病的生态防治

口腔环境存在宿主和微生物组成的多种微生态。微生态学的一个重要研究应用领域是生态疗法或生态防治。它包括各种生物措施在内的、一切促进由微生物群与宿主及环境构成的生态系、从病理性组合变为生理性组合的、符合生态学原则的医疗措施。生态防治的本质是恢复生态平衡，使生态系回归自然、协调、和谐的动态平衡状态。口腔中常见病（如龋病、牙周病等）均属生态失调性疾病，某些全身性疾病（如糖尿病等）也会存在口腔生态失衡问题，可以通过生态防治的途径进行疾病的综合防治。

第一节　口腔疾病生态防治的基本原则

口腔生态防治是指用生态学的观点和方法，从群体防治和个体预防保健的角度研究口腔疾病的整体防治方法、措施和途径。生态防治作为口腔常见病、多发病防治的重要方式正愈来愈受到人们的关注。

口腔生态防治的理论基础在于生态平衡和生态失调是可相互转换的。生态防治的目的就是设法维护口腔生态平衡，防止生态失调的发生和（或）调节生态失调为生态平衡，防治疾病的发生。

生态防治的目的是恢复口腔生态的平衡，消除引起失调的内、外环境因素。生态防治包括环境、宿主和微生物群三个方面。在环境方面，应清除引起生态失衡的病理状态，去除或缓解异常的解剖结构；在宿主方面，应通过免疫、营养和体育锻炼来提高宿主的适应性，保持生态平衡，减少疾病的发生；在微生物群方面，应提高定植抵抗力（colonization resistance），即是宿主对致病菌和潜在致病菌在正常微生物群中定居和繁殖的阻抗力或抵抗力。

口腔生态防治的基本原则是：

1. 去除引起生态失调的病理状态　生态失调可引起病理状态或疾病，而病理状态或疾病又可引起或保持生态失调。在调整生态失调时，应注意排除这些疾病的作用。

2. 去除异常的解剖结构　异常解剖结构包括牙齿不整齐、牙齿发育不良（如畸形舌侧沟）、牙齿深的窝沟点隙等。

3. 提高宿主的适应性，提高对正常菌群不利作用的抵抗力，包括免疫、营养、锻炼及一切保健措施。

4. 干预微生物　生态学理论认为疾病的预防不仅可以通过抑制病原菌，也可通过干扰影响菌斑微生物的多因素而起作用。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

生态防治措施主要包括:①保护宏观生态环境,改善微生态环境;②提高宿主免疫力,增强宿主的适应性;③营养调整;④合理使用抗生素;⑤根据种群的缺失及时使用微生态制剂。

第二节　口腔疾病生态防治的主要措施

一、龋病的生态防治

龋病是以细菌因素为主的口腔多因素失衡引起的慢性感染性疾病,其发生与牙菌斑生物膜、食物、牙齿解剖结构及唾液等多种成分相关。因此,其生态防治需要从多方面出发:

(一) 菌斑控制

机械清除菌斑是最简易的龋病生态防治方法,其基本功能原则是最大限度清除牙表面菌斑生物膜,减少致龋菌产酸,减少对牙齿表面的磨损和损伤。刷牙是最常用的有效方法,但单纯的刷牙通常只能清除口内50%左右的菌斑,而难以消除邻面菌斑。其他特殊的牙间清洁工具(如牙线、牙间隙刷、牙签等)帮助去除牙间隙的菌斑和软垢。

也可以使用化学方法,包括氯己定、三氯羟苯醚等。氯己定可以控制菌斑,干扰细菌代谢,抑制产酸。适宜浓度的氯己定可减少pH的快速变化对菌斑微生物和脱矿的影响,既防治了疾病,又不破坏现有的口腔生态平衡。目前也有将植物提取物(黄芩、厚朴、五倍子、金银花、两面针)、非特异性蛋白酶、茶多酚、甲壳胺等加入到漱口剂或牙膏中,起到抑制致龋菌、阻止细菌附着等效果。

(二) 增强牙齿抗龋力

在孕期和幼儿期,注意营养和全身健康,使乳、恒牙正常发育和萌出,减少牙冠钙化不全及釉质发育不全的出现。在恒牙萌出期合理使用氟化物,促使年轻恒牙钙化完全,增强抗腐蚀能力。

对于适龄儿童的牙齿,进行颊、殆面窝沟封闭,是阻止菌斑滞留的重要措施。窝沟封闭是指不去除咬合面牙体组织,在其上涂布一层粘接性树脂,保护釉质不受细菌及代谢产物侵蚀,增强牙齿抗龋能力,从而达到预防龋病发生的一种有效防龋方法。窝沟封闭剂原理是:用高分子材料把牙齿的窝沟填平,使牙面变得光滑易清洁,形成一层保护性屏障,阻止细菌及食物残渣进入窝沟,同时使窝沟内原有细菌因断绝营养而逐渐死亡,从而预防窝沟龋的发生,使早期龋损停止发展。

(三) 刺激唾液分泌

唾液的机械冲洗作用可清除口腔内残留的糖,唾液中所含缓冲对和碱性物质——碳酸根离子、尿素、氨、肽等可增加局部pH,丰富的矿物质(如Ca^{2+}、F^-、PO_3等)能促进再矿化。

对于唾液分泌量降低的患者,可以服用增加唾液分泌量的盐酸西维美林或者润湿口腔的包衣药物;咀嚼无糖口香糖通过机械和味觉刺激可促进唾液分泌。对于唾液分泌功能障碍的个体,可以使用与唾液成分相似的人工唾液,定时含漱,起到调节口腔微生态作用。

(四) 控制糖的摄入

糖类食品是人类的主要营养成分之一,也是食品与饮料的常用添加剂。日常生活中人摄入糖类有蔗糖、淀粉、乳糖等。其中可酵解糖类在口腔内长时间停留,激活致龋变形链球菌过度生长,在胞外产生细胞外多糖促进菌斑形成。糖被吸收后产生胞内多糖代谢产酸,引

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

起低 pH，将打破口腔生态平衡，引起微生态失调。生态防治是设法减少糖摄入的频率和数量。

1. 减少含游离糖食物摄取（如零食、软饮料等），多食淀粉类食物（如马铃薯、面包、米饭等）、含糖的新鲜水果及蔬菜。

2. 食用仅被少数菌利用、不产酸的糖代用品；摄糖后注意口腔清洁，减少糖在口腔内滞留时间。

（五）使用氟化物

氟是口腔微生态中的重要因子。适量氟化物能调节牙-唾液界面的脱矿-再矿化平衡，提高釉质的抗酸力，促进再矿化。同时，氟抑制细菌生长、代谢，通过产酸速度减慢 pH 的变化，进而减少菌斑细菌向致病方面的转变。氟化物可以通过全身或者局部方式产生作用。例如饮水氟化、含氟漱口水、含氟牙膏、氟保护漆、氟化泡沫等方式，均对龋病防治显示出良好的效果。

（六）生物替代疗法

使用拮抗菌控制病原菌的设想已经有 100 多年，称为替代疗法（replacement therapy）。其基本思想是用致龋菌毒力因子缺陷株（也称拮抗菌、效应菌）替代野生株（病原菌）定植于生态空间，恢复口腔的生态平衡，达到减少龋齿的生态治疗的目的。如何提高拮抗菌（效应菌）在口腔的稳定定植力非常关键，替代方法中的效应菌必须满足以下条件：①具有与口腔固有细菌竞争的能力；②对牙面有亲和力，能在有蔗糖存在的情况下黏附于牙面上；③能在口腔中迅速生长；④能适应其所处的口腔环境，尤其是能适应 pH 的迅速变化；⑤能适应所处微生态环境，抵御菌斑基质的攻击。目前，替代疗法主要有两种形式：①预空定植：即在病原菌定植之前，用效应菌占据牙菌斑中的生态位点，建立微生态系，从而排除病原菌；②竞争替代：即用竞争力更强的菌株将病原菌从牙菌斑中排除。

二、牙周疾病

（一）菌斑控制

菌斑是牙周微生态失衡的主要因素，而且去除几小时内还会不断在牙面重新形成，因此必须坚持每天有效去除菌斑，才能预防牙周病的发生和复发。对于已有牙周病者，除了治疗过程中彻底清除牙面菌斑、牙石外，还必须掌握自我菌斑控制的方法，才能保证牙周病治疗的顺利进行以及维持疗效、防止复发。

刷牙或使用牙线、牙签、洁治等机械方法是去除牙菌斑、清洁牙、保持口腔卫生的重要措施。一般漱口大多是利用水在口内流动的冲击力去除滞留的食物残屑，能暂时减少口腔微生物的数量，使口腔保持清新，但漱口的力量不足以去除菌斑。由于个人清除牙菌斑的能力和效果有限，牙的有些部位是很难清洁干净的。预防性清洁术（dental prophylaxis）是口腔专业人员用口腔器械帮助患者彻底清除牙菌斑。通常是用特制的牙邻面清洁器或牙线先清除牙邻面菌斑，然后用橡皮杯蘸上打磨膏清洁牙的平滑面。

在机械性控制菌斑的基础上，配合化学制剂可有效地控制菌斑，达到预防和治疗牙周病的目的。化学制剂需要依靠一些载体，如含漱剂、牙膏、口香糖、牙周袋冲洗液、缓释装置等传到牙周局部，起到控制菌斑作用。常用的控制菌斑化学制剂包括：氯己定（洗必泰）、酚类化合物、季铵化合物、三氯羟苯醚等。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）控制局部相关危险因素

1. 改善食物嵌塞　食物嵌塞是导致局部牙周组织破坏最常见的原因。由于嵌塞的机械作用和细菌的定植，除引起牙周组织的炎症外，还可引起牙龈退缩、邻面龋、牙槽骨吸收等。

引起食物嵌塞的原因有多方面，需要明确造成嵌塞的原因，采取相应方法。垂直型食物嵌塞用选磨法矫治。牙面重度磨损，通过选磨法重建食物溢出沟，恢复牙的生理外形，调整边缘嵴，恢复外展隙，来防止食物嵌塞。也可以重新制作引起食物嵌塞的修复体，并矫治牙列不齐等。对于水平食物嵌塞，可以考虑做食物嵌塞矫治器，或及时用牙线、牙签去除嵌塞的食物。

2. 调殆　创伤殆加重和加速牙周炎的破坏进程，妨碍牙周组织的恢复。调殆通过磨改牙的外形、牙体和牙列修复、正畸方法使牙移动、正殆外科手术等消除早接触，消除干扰，建立有利于牙周组织的功能性咬合关系，减少对牙周组织的创伤，促进牙周组织的修复。

3. 预防、矫治错殆畸形　错殆造成菌斑滞留，咬合力不均匀，导致牙周组织损伤，是牙周微生态失调的重要原因。因此，对错殆畸形进行预防和矫治是牙周病生态防治的必要手段。预防错殆畸形措施包括：宣传教育，提高母亲的预防意识；给予儿童有利于颌面部正常发育的食物；预防和治疗乳牙龋，保持牙体完整；及时处理乳恒牙替换障碍；处理额外牙、先天缺牙，及时矫治各种不良习惯。矫治已经发生的各种错殆畸形，如牙错位、牙列拥挤、反殆、深覆殆等。在正畸过程中，要设计用力适当，避免牙周创伤，同时严格实施菌斑控制措施，减少牙周病的发生。

4. 制作良好修复体　制作精良合理的修复体，重新恢复咀嚼的功能性刺激是恢复口腔生态、维持牙周健康的不可少的基础。修复体制作过程中要注意：固定修复体边缘要放在适当的位置，修复体的邻接点与殆面有良好的外形接触区和接触点，避免食物嵌塞；桥体、卡环、基托设计要尽可能地减少菌斑和食物残渣的堆积，便于自洁。

（三）提高宿主抵抗力

牙周微生态中，全身性因素关系到牙周组织对局部刺激性因素的反应，影响牙周组织破坏的严重程度和修复能力。因此，牙周病的生态防治不仅需要消除和控制局部刺激因素，还需要提高机体抵抗力，增强牙周组织对致病因子的抵抗力和免疫力。包括积极治疗和控制与牙周病发生相关的全身性疾病，如内分泌紊乱、糖尿病等。加强高危人群的监测。青春期和妊娠期是牙周病（特别是牙龈炎）发生的高危期，除了积极调整内分泌平衡外，特别要注意对高危人群的专业性口腔护理，定期口腔检查，进行常规的牙周冲洗和洁治。

三、口腔黏膜病

口腔黏膜病的发生与微生态的改变有密切关系，一方面年龄增长、精神因素、全身性疾病、药物服用等引起口腔黏膜组织免疫力下降；另一方面，局部不良刺激因素、唾液成分改变、口腔菌群失调等引起局部变化，均是口腔黏膜微生态变化的重要方面。口腔黏膜病生态防治也是针对上诉因素开展的。

（一）使用药物

感染性口腔黏膜疾病的首要防治原则是选择合适的药物，以抑制细菌、真菌或病毒感染的发生或加重。口腔念珠菌患者可以使用0.1%～0.5%甲紫水溶液，可治疗婴幼儿鹅口疮

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

和口角炎。0.1% ~2% 氯己定溶液或1% 凝胶局部涂布、冲洗或含漱可治疗口角炎、义齿性口炎等。西地碘含片具有高效、低毒和广谱杀菌效果，可用于治疗舌炎。制霉菌素软膏或霜剂可治疗口角炎、义齿性口炎等。严重病员需要使用全身治疗的药物，包括两性霉素、活力康唑、普沙康唑等，但需要严重掌握用药指征和用量。为给口腔菌群平衡创造条件，可以考虑停用或少用抗生素、糖皮质激素。对于反复发作、症状严重的病员，要考虑是否有免疫缺陷，可试用转移因子等。

（二）恢复或保持良好的口腔生态环境

通常采用全身和局部相结合的治疗措施。利用1% ~4% 碳酸氢钠溶液进行唾液的碱性化等，能造成不利于白假丝酵母菌生长的碱性环境，抑制其生长。常用来治疗婴幼儿鹅口疮和预防老年人口腔念珠菌病。

（三）去除局部刺激性因素

需要去除或纠正的不良刺激因素包括：

1. 龋齿、残根、残冠　龋齿、残根、残冠的危害在于成为细菌的栖息场所。残缺的牙冠或者对于严重磨耗牙齿的锐利的边缘及牙尖会对口腔黏膜造成的机械性创伤，刺激损害降低口腔黏膜的耐受力，甚至形成创伤性溃疡或癌前病损白斑，长期慢性溃疡会导致癌变。

2. 不良修复体　人体失牙后进行义齿修复时，如果义齿制作不耐受，长期慢性刺激而导致黏膜溃疡、糜烂而出现口腔黏膜破损，所以，义齿如不适合要及时调整和更换。

活动义齿的材料不同，细菌的附属性不同，有些材料短时间内会有大量细菌产生并附着，尤其是一些特殊菌的产生，对口腔黏膜具有相当强的破坏作用。

3. 不良习惯　喜欢吃过烫的食物、饮用刚倒出来的沸水、喜欢咀嚼硬物、嚼槟榔、吸烟等不良习惯会对口腔黏膜造成极大的损伤，使黏膜的抵抗力下降。

（四）提高宿主抵抗力

通过对精神因素、内分泌因素、免疫因素进行干预，提高宿主抵抗力。保证充足的睡眠时间，避免过度疲劳；注意生活起居规律性和营养均衡性，坚持体育锻炼，多吃蔬菜水果，保持大便通畅，防止便秘。补充微量元素。某些微量元素如锌、碘、镁、硒及铁、钙、锰的缺乏可导致一些黏膜病的发生。

四、义齿修复及固定矫治中口腔问题的生态防治

由于戴用可摘局部义齿或固定矫治器后改变宿主口腔的生态空间结构，影响口腔生理性自洁作用，进而引起口腔微生态失调，从而导致龋病、牙周病等多种口腔病变的发生，所以防治工作变得越来越重要。防治措施包括：

（一）修复或矫治前的口腔准备

1. 按照龋病和牙周病生态防治的方法和措施，进行口腔问题的处理。包括已有龋齿的充填、深窝沟点隙的封闭处理、残冠残根的拔除、牙周洁治等。若已存在龈炎、牙周炎，应作牙周治疗，尽量使其恢复至健康水平。

2. 保持口腔卫生，防止菌斑形成。指导患者掌握、选择并实施菌斑控制的各项方法，包括化学药物、机械清除法等，坚持有效的菌斑控制。

3. 在修复前，应帮助患者理解保持口腔、义齿、矫治器等卫生的价值，要求患者认识到菌斑控制、维持口腔生态平衡的重要意义，养成每天刷牙两次或者餐后刷牙的习惯，建议使

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

用含氟牙膏。

（二）义齿设计中应注意的问题

1. 可摘局部义齿结构尽可能简单，卡环、支托、连接体、基托都不同程度影响生理性自洁作用，应尽可能简化设计，减少不必要的部件、结构。

2. 义齿各部件应高度抛光。义齿表面欠光滑，容易导致细菌与菌斑聚集。

3. 在不影响其强度和口腔功能及舒适的前提下，义齿基托、连接体应尽可能远离龈缘，避免基牙龈缘外面菌斑增加，导致基牙该部位龋坏或牙周炎发生。

（三）义齿清洁

定期对义齿进行清洁。可以使用机械法清洁义齿，包括刷牙、牙膏、牙粉、超声法等。也可以使用化学法，例如次氯酸钠溶液、过氧化氢溶液等浸泡义齿，应用超声装置可增加消毒液的效力，并且不破坏义齿表面的光洁度。

（四）菌斑控制

控制菌斑方法主要是应用药物及机械清除。定期进行龈上洁治可帮助固定矫治患者清除堆积菌斑，减少牙龈增生，从而实现牙周健康。应用氯己定漱口并给予含氟洁牙剂，患者口腔卫生状况得到改善，菌斑及龈炎指数下降。机械法清洁牙齿包括刷牙、牙线、牙签、牙间隙刷和冲牙器等。

对于固定正畸患者，日常刷牙可以选用清除菌斑能力更高的正畸专用牙刷、三头牙刷或者超声波牙刷，牙间隙刷还可以用于清除弓丝与牙面之间或托槽周围的菌斑和软垢。对于有固定矫治装置的正畸患者，冲牙器显示出较好的优越性，同时冲洗过程产生的脉冲水可以不断地按摩和刺激牙龈，使牙龈更健康。

（五）定期口腔复查

由于戴用可摘局部义齿增加了患者保持口腔卫生的难度，在戴义齿的初期，虽然大多数患者能保持良好的口腔卫生，但随着时间的延长，其口腔卫生逐渐变差，针对此种情况，患者应定期复查、治疗、修改，不仅能长期保持义齿的功能，而且可以预防余留牙或口腔组织的病变。

第三节　全身性疾病口腔并发症的生态防治

一、白血病

白血病是一种原因不明的造血系统的恶性疾病，其特点为白血病细胞在骨髓及其他造血组织中弥漫性恶性增生，且浸润破坏其他组织和脏器，产生各种症状和体征。在长期的治疗过程中，由于化疗药物的抑制杀伤作用，使正常血细胞受到损伤，患者免疫功能急剧下降，黏膜细胞受损其屏障作用大大减弱；大量激素、广谱抗生素的使用，导致口腔菌群失调，口腔内的正常菌种受到抑制，某些致病菌和真菌异常繁殖导致口腔溃疡、感染发生，进而感染扩散至全身。轻则增加患者痛苦，严重者致败血症，影响化疗的顺利进行，甚至威胁生命。由于化疗药物的毒副作用也会对唾液腺产生危害，引起唾液分泌减少。

（一）菌斑控制

白血病患者菌斑控制同样可以采用机械方法，但是考虑到口腔黏膜、牙龈的损伤，宜选

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

用软毛牙刷，避免较大力量引起的牙龈或黏膜损伤。化学药物（如氯己定含漱液等）是值得向白血病患者推荐的菌斑控制方法。

（二）口腔 pH 调节

由于化疗后往往出现唾液分泌减少、口腔黏膜干燥、黏稠唾液的集聚，使口腔 pH 值发生改变，导致口腔黏膜发生病变。对于在化疗期间患者口腔内 pH 值降低者，可采用 4% 碳酸氢钠溶液漱口，对偏碱者则用 2% 硼酸液漱口，中性者可用呋喃西啉溶液漱口，以调整口腔 pH 值达正常水平。如患者有恶心感不能接受时，可采用生理盐水漱口，每天饭后、睡前含漱。

（三）及时处理口腔黏膜病变

口腔黏膜溃疡通常发生在化疗后，好发部位有：舌尖部、舌边缘、两侧颊黏膜、上腭、齿龈、口唇内侧、咽部等。口腔黏膜溃疡时，要鼓励患者坚持漱口，每 2 小时一次，局部用冰硼散、甲紫等擦患处。口腔黏膜有白色假膜出现时，应立即涂片找真菌，有真菌出现时，可局部用制霉菌素直到控制真菌生长为止。清除口腔刺激物，用软毛刷刷牙，每天早晚各一次，有活动义齿的患者每天应将义齿取出，至少 8 小时一次，避免牙龈发炎。

（四）注意饮食、加强营养、提高机体抵抗力

化疗期间应注意饮食，保护口腔，禁止食用刺激性较大及较硬或骨刺较多容易划伤口腔黏膜的食物，宜进食营养丰富、高蛋白、高维生素易消化饮食。对口腔溃疡疼痛不愿进食者，除采取止痛措施外，要鼓励其进食，给予温、凉、软、无刺激性的食物或丰富流质饮食，以增强机体抵抗力。

二、糖尿病

糖尿病患者血糖增高，唾液中葡萄糖含量亦会相应升高，有利于细菌的生长和繁殖，钙质增加，易形成牙石。此时，牙石中细菌的大量生长和繁殖，易引起牙龈炎。糖尿病患者得牙周病的机会增多。

由于患者失水唾液减少的原因，口腔干燥症成为糖尿病患者的口腔常见症状之一。由于糖尿病的原因，使老年人腮腺内抵抗力低下，会出现潜伏慢性感染，刺激末梢腺管增生，这会加重患者出现口干表现。如果血糖控制不佳，龋齿发生的机会增多，而且龋洞进展迅速，牙齿破坏严重。

口腔黏膜病的症状包括嘴干、口唇黏膜灼痛、淤血、水肿或痛性干裂。由于口腔黏膜干燥，降低了自洁能力，患者口腔黏膜抵抗力下降，加之菌群失调，细菌和真菌肆意生长，严重者可引起球菌或酵母菌性口炎，甚至造成组织坏死。

糖尿病患者口腔病变的生态防治原则是：控制血糖，注意口腔卫生和口腔保健，积极、正确地处理牙龈炎和牙周炎。

（一）控制血糖

积极治疗糖尿病，口腔医师与内科医师配合好，把血糖控制在理想范围内，这是糖尿病性口腔疾病治疗的基本措施。要避免得鹅口疮，并控制住糖尿病，请勿吸烟；如戴义齿，要每天取下来清洁。控制好血糖，还能有助于预防或减轻糖尿病引起的口干症状。

（二）控制菌斑、注意口腔保健

除常规的刷牙等菌斑控制措施以外，洁牙是口腔卫生保健和防治疾病的重要措施。牙

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

结石可在短期内迅速形成，由于结石的沉积，牙龈被剥离，牙周膜被损坏，很快形成牙周袋。这样，使食物残屑很容易在牙周袋内嵌塞，利于微生物生长，加重牙周组织的破坏。“病从口入”，洁牙可以消除口腔和牙列局部的许多致病因子，去除牙石、菌斑和烟斑，治疗口腔牙周炎和牙龈炎。

在正确刷牙的基础上，要特别注意牙龈线、难以触及的牙舌腭侧以及义齿冠、补牙或其他处理过的部位。这样可以大幅降低龋齿、牙龈疾病和其他牙齿问题出现的机会。

（三）积极处理口腔疾病

龋病牙周病的处理将改变口腔生态中的宿主因素，将起到好的防治效果。

牙龋病患者要及时充填治疗龋洞的牙齿，力争防止和避免病菌自牙髓根管向根尖周组织扩散。

当糖尿病患者牙周炎严重、血糖水平较高、一般情况很差时，暂不做其他处理。可先用0.15%氯己定液含漱，或2%～3%碳酸氢钠液冲洗清洁患处，然后局部涂以3%碘甘油。严重糖尿病患者应以全身治疗为主，待血糖控制后再进行口腔治疗。

有牙石应做洁治术。当全口牙周炎组织炎症基本控制，应做初步洁治术，最好每半年或一年进行一次洁治术。全口洁治术后，牙周炎症基本控制、血糖稳定（接近正常即可）和全身状态较佳者，可选择刮治术、袋内襞刮术、龈切除术、龈翻瓣术等治疗，以改变牙周袋的微生态环境。

三、癌症放化疗后

颌面部恶性肿瘤的放疗和全身其他部位肿瘤的化疗后常发生口腔并发症。引起口腔并发症的因素包括对口腔生态黏膜屏障的破坏、唾液腺功能损害以及口腔菌群失衡等。

药物或放射线对口腔组织的直接致死和亚致死损伤、毒性损伤以及免疫和其他保护系统的功能减弱（如骨髓抑制、组织中免疫细胞及唾液保护成分丧失）干扰了组织的正常愈合功能，导致黏膜萎缩、胶原断裂、组织坏死，进而上皮剥脱，形成口腔黏膜炎。正常口腔黏膜有多种屏障功能防止病原体感染，放化疗可使患者免疫力下降，致病菌可因黏膜屏障的破坏而进入机体，进而导致局部口腔感染和全身感染。

大量使用抗生素或肾上腺皮质激素改变了口腔菌群平衡，形成利于真菌生长的环境，有助于口腔念珠菌感染的发生。在免疫抑制的条件下，潜伏病毒重新活化，也可导致口腔感染。单纯疱疹病毒是骨髓抑制化疗患者口腔病损最常见的病原体。

化疗、放疗、免疫抑制治疗可影响唾液腺的分泌功能。唾液腺功能低下造成唾液量减少并带来更多的口腔症状，如猖獗龋、牙周和黏膜感染等。唾液中含有大量可促进牙体再矿化的离子以及IgA、IgG等，唾液量的减少加剧了猖獗龋发生。

（一）治疗前口腔准备

放化疗前口腔准备：放化疗前应认真评估口腔生态状况，获得口腔健康的基本资料。对现有口腔疾病进行治疗，如需拔牙，应在治疗前14天完成，去除局部和全身感染因素，并提出完整的口腔保健计划，对放疗患者要至少保护好一个大唾液腺，防止口腔过度干燥。

（二）治疗期间口腔卫生措施

少食导致菌斑堆积致龋食物（如蔗糖、饼干、巧克力等），多饮水，忌食物过热、过硬、过酸或过甜、辛辣、刺激性强，戒烟酒。

保持口腔清洁，漱口4～7次/天，漱口液选用2%～3%小苏打水，可中和酸，稀释黏稠的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

唾液；口泰（即氯己定）漱口液有助于控制菌斑，预防龋齿，每次含漱至少1分钟。同时用鼓颊和吸吮交替运动漱口1～2分钟，以清除松动的牙垢。

保护牙齿和牙龈。进食后刷牙，使用软毛牙刷和含氟牙膏，如不能耐受牙刷的刺激，可用棉签拭纸清洁牙齿。治疗期间定期检查。

（三）口腔干燥症的防治

口腔干燥症除了唾液分泌量减少，还会造成其性质的改变，使唾液变得黏稠，酸碱度降低，从而破坏唾液的润滑保护功能。

对于口干症患者可以使用人工唾液、咀嚼口香糖等。对于此类患者应嘱其进食含水高、易消化的食物，保证每天饮水3000～4000ml，经常予菊花、金银花、麦冬泡水饮用，以保证口腔黏膜的湿润。口干严重者可以盐水40ml、庆大霉素16万U、玻璃酸酯酶3000U、地塞米松5mg雾化吸入每天2次。

猖獗龋需要一个完整的序列治疗。首先需要对个体龋敏感性和活动性进行评估；然后用含有氟释放能力的材料进行龋病治疗，如玻璃离子等；最后采取针对性的预防措施来减少新发龋，包括局部使用氟化物涂剂（如含氟漱口液、含氟牙膏、氟保护漆等）、抗菌漱口水、改变饮食习惯等。

（四）口腔黏膜炎的防治

口腔黏膜炎患者应测口腔pH值，及时进行口腔内分泌物细菌学培养。根据口腔pH值及细菌学培养情况选择漱口液及局部用药，细菌感染一般用2%氯己定、1%过氧化氢溶液含漱，局部用药选西瓜霜、金霉素甘油等涂布，同时配合全身应用抗生素；真菌感染用2%～3%碳酸氢钠液含漱，制霉菌素甘油剂、氟康唑局部涂布。顽固性真菌感染应全身应用抗真菌药物。疱疹病毒感染，清洁口腔后可用阿昔洛韦霜剂或甲紫小面积涂抹，同时给予高蛋白、高热量、高维生素的流质、半流质或软食，少食多餐，进食速度适中，以免刺激和损伤黏膜。

四、器官移植术后

器官移植后大量长期免疫抑制剂使用，机体免疫防御系统遭到破坏和抑制，机体免疫力降低；各种致病微生物乘虚而入，引发感染。由于机体处于免疫抑制状态，大剂量广谱抗生素的长时间应用，不可避免地带来双重感染，使病情复杂化。感染可以诱发排斥反应的发生。因此，感染是肾移植后最严重的并发症。细菌感染占第一位，真菌感染次之。除呼吸系统、泌尿系统外，口腔成为最容易发生感染的场所之一。

按照器官移植前后分期，器官移植术口腔并发症的生态防治措施包括：

1. 移植术前进行必要的牙周菌斑洁治。如果口腔内存在活动性的感染病灶，如急性牙周炎、根尖周炎等，需要使用抗生素预防感染扩散。如果有条件患者能够耐受，则需要积极治疗原有口腔疾病，例如牙周治疗、残根的拔除等。对于一些影响口腔清洁措施的因素，需要尽早去除，如去除固定正畸矫治器、不良修复体等。

2. 移植术后，除进行仔细的机械性菌斑控制（包括每天刷牙）外，患者需要使用抗菌性漱口水。唾液功能障碍的个体，人工唾液和含氟漱口水是必不可少的。由于器官移植个体的特殊性，在进行抗真菌、抗病毒使用药物时，一定注意其对全身状况的影响，避免药物对移植器官的影响。

（尹伟　郝玉庆）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

参 考 文 献

1. 胡德渝. 预防口腔医学. 北京：人民卫生出版社，2012
2. 周学东. 口腔生态学. 北京：军事医学科学出版社，1999
3. 周曾同，沈雪敏. 口腔黏膜病临床治疗 V：口腔念珠菌病诊断与治疗进展. 中华口腔医学杂志，2006，41：767-769
4. 刘震华，赵今. 固定矫治对儿童口腔微生态环境的影响. 中国微生态学杂志，2011，23：86-88
5. 何文丹，刘英志，陈东，等. 口腔卫生综合预防措施对固定矫治中牙周健康的影响. 临床口腔医学杂志，2010，26：355-356
6. 律娜，夏娟，李春阳，等. 国内防治放（化）疗所致口腔黏膜炎研究文献的循证医学分析. 实用口腔医学杂志，2007，23：239-242
7. Cuozzo FP，Ungar PS，Sauther ML. Primate dental ecology：How teeth respond to the environment. Am J Phys Anthropol. 2012 Jun；148（2）：159-62. doi：10. 1002/ajpa. 22082
8. Sanders NL. Evidence-based care in orthodontics and periodontics：a review of the literature. J Am Dent Assoc，1999，130（4）：521-527
9. Ship JA. Diabetes and oral health：an overview. J Am Dent Assoc，2003，134 Spec No：4S-10S. Review
10. Cho SY，Cheng AC，Cheng MC. Oral care for children with leukaemia. Hong Kong Med J，2000，6（2）：203-208
11. Garfunkel AA. Oral mucositis-the search for a solution. N Engl J Med，2004，351（25）：2649-2651
12. Little JW，Falace DA，Miller CS，et al. Dental Management of the Medically Compromised Patient. St. Louis，MO：Mosby Inc.，2008
13. Stokman MA，Spijkervet FK，Boezen HM，et al. Preventive intervention possibilities in radiotherapy-and chemotherapy-induced oral mucositis：results of meta-analyses. J Dent Res，2006，85：690-700
14. NIDCR. Dental Management of the Organ Transplant Patient. http：//www. nidcr. nih. gov/Oral Health/Topics/Organ Transplantation Oral Health/Organ Transplant Prof. html

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第十七章
口腔微生态学的研究技术

第一节　口腔正常微生物群落分析的传统技术

生长是微生物功能的一个重要组成部分。在微生物学中，生长一词被定义为细胞数目的增加，也就是说，微生物生长与细胞数目增多有关，而不是单个细胞的增大。生长的速度是指单位时间内细胞数目和细胞总量的变化，微生物生长速率与生长周期密切相关。

一、微生物生长曲线的测定

根据微生物细胞生长的特点，将其分为迟缓生长期、对数（或指数）生长期、稳定生长期和衰亡期4个生长期。在不同生长周期，细菌的生长速率存在明显差异，通常用生长曲线表示细菌从生长开始到全部死亡的动态变化。

（一）原理

将已知浓度的细菌液定量接种到定量的培养液中，在适宜的条件下培养后，细菌的生长数目在不同培养时间内出现动态的变化，以活菌数的对数为纵坐标，以不同培养时间为横坐标，绘制生长曲线（图17-1）。

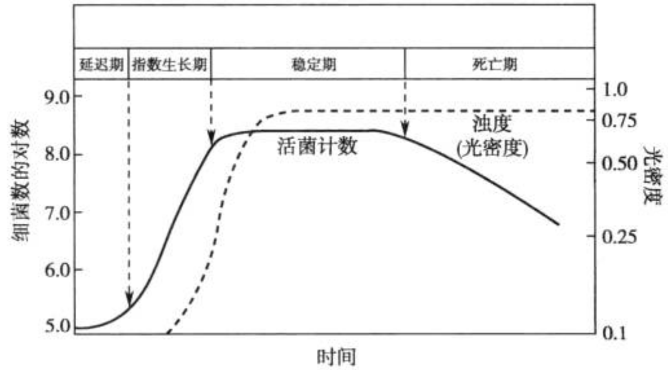


图17-1　生长曲线示例

注：迟缓生长期（lag phase）：细菌分裂繁殖迟缓。对数生长期（logarithmic phase）：细菌生长迅速，活菌数目呈对数上升。稳定生长期（stationary phase）：细菌繁殖速度渐趋下降，死菌数逐渐上升。衰亡期（decline phase）：细菌的繁殖速度减慢至停止，死菌数迅速超过活菌数。细胞出现多形态的衰退型和肿胀自溶

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）方法

生长曲线测定最常用的方法有比浊法和活菌计数法。

1. 比浊法　将已知浓度的细菌液定量接种到定量的培养液中，在适宜的条件下培养后，测定细菌培养悬液的浊度（A 值）。以细菌悬液的 A 值为纵坐标，以不同培养时间为横坐标，绘制生长曲线。

2. 活菌计数法　在微生物生态学研究中，计算活菌细胞数能更真实地反映细菌生长的动态变化。活菌细胞是指可以分裂和生成后代的细胞，通常采用平板菌落计数法测定（详见本节菌落形成单位的测定）。将已知浓度的细菌液定量接种到定量的培养液中，在适宜的条件下培养后，取定量的菌液接种于琼脂平板表面培养。以菌落增长数目的对数为纵坐标，以不同培养时间为横坐标，绘制生长曲线。

二、菌落形成单位的测定

生态学研究的一个重要内容是定时、定位和定量检测生态系中生物体的数量，特别是定量样本中的活菌细胞含量。目前，国际上多采用菌落形成单位（colony forming units，CFU），而不是使用传统的活菌绝对值计数法来表示样品中的活菌含量，所以平板菌落计数法成为检测样本中活菌含量的一种最常用的微生物学实验技术。目前常用的平板菌落计数法有涂布法、滴注法和螺旋仪接种法。此外，倾注法也有报道。

（一）原理

定时、定位采集样本并用适当的运送方法送到实验室后，将待测样品经分散处理和适当稀释，其中的微生物被分散成单个细胞，取定量的稀释样液接种到平板上，放置 37℃ 孵育箱（孵育的大气条件及孵育时间根据菌种选择），经过孵育培养后由每个单细胞生长繁殖而形成肉眼可见的可计数的菌落。计数菌落的数量并根据稀释度计算出定量样品中的微生物活菌含量。

（二）方法

平板菌落计数方法因其接种方式的不同被分为涂布接种法、滴注接种法、倾注接种法和螺旋仪接种法。4 种平板菌落计数法的操作程序基本相同，包括：定时、定位的采集样本、运送、稀释、接种、孵育和计数菌落数量等，不同点主要在稀释和接种两项操作上。

1. 倾注法　取定量的细菌稀释液放入无菌的小瓶中，然后加入已融化并冷却至 50℃ 左右的营养琼脂培养基混合，再倾注于直径为 90mm 的无菌平板，使其分布均匀。放置适当的条件下孵育后计数琼脂中表层及深层所有的菌落。倾注接种法（倾注平板法）操作步骤见图 17-2 所示。

2. 滴注接种法　用微量稀释器取 25μl 或 50μl 适当稀释度（10^5 CFU/ml、10^4 CFU/ml、



图 17-2　倾注平板法的操作程序

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

10^3CFU/ml）的样本滴注于琼脂表面（每个浓度作3个平行样），待其干后放置孵育箱中孵育（图17-3、图17-4）。然后计数平板表面的菌落数。



图17-3　滴注法的接种程序

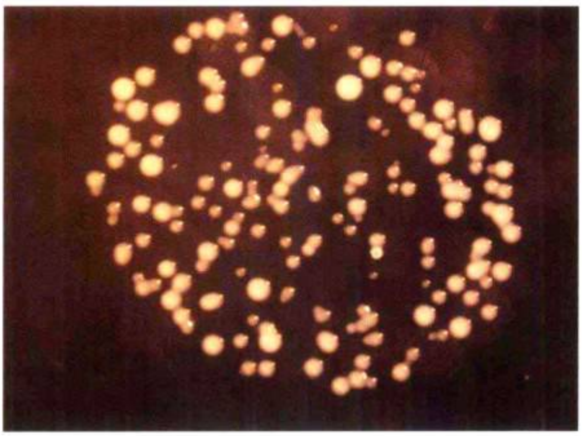


图17-4　滴注法的平板菌落（唾液样本）

3. 螺旋仪接种法　螺旋接种仪是目前最为先进的活菌计数接种方法，样本液被自动稀释和画线接种于琼脂平板表面，经孵育后的细菌菌落沿螺旋形轨迹均匀生长（图17-5），使样

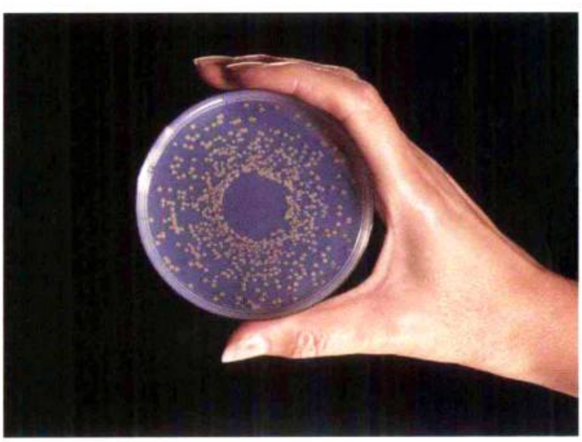


图17-5　螺旋仪接种法的平板菌落（菌斑样本）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

本中细菌菌落的观察和计数更加准确。螺旋仪接种法是直接由现代微生物自动接种仪(螺旋接种仪)完成样本液的稀释、接种和涂布。经孵育后的平板菌落在螺旋轨迹上形成,分布散在均匀,可以使用计数板人工计数或自动菌落计数仪计数菌落。

4. 涂布接种法是细菌活菌计数常用的一种方法(图 17-6)。涂布接种法的菌落分布见图 17-7,滴注接种法的菌落分布见图 17-8 ~ 图 17-10。

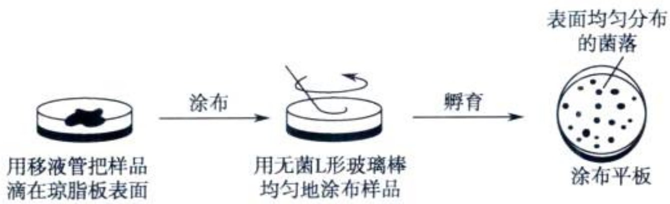


图 17-6　涂布法图示

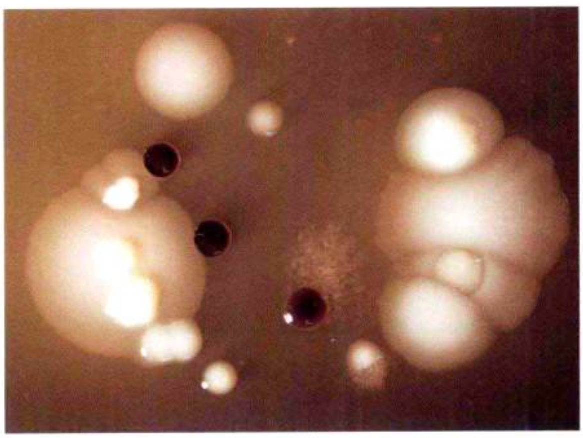


图 17-7　涂布法平板菌落(龈缘菌斑样本)



图 17-8　滴注法平板菌落(菌斑样本)



图 17-9　滴注法平板菌落(唾液样本)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注



图 17-10 滴注法平板菌落(龈下菌斑样本)

三、微生物黏附力检测

微生物的黏附是微生物定植和致病的基础。

黏附力的测定:

1. 介质黏附 选择玻片、玻棒、羟基磷灰石(HA)或离体牙作为黏附的介质。

2. 方法 采集介质表面的黏附物用称重法、活菌计数法、液体闪烁计数法或比浊法测量细菌在介质表面的黏附量大小,以推断其黏附力(图 17-11)。通过在培养液中加入人工唾液或胶原溶液,或用唾液、胶原溶液包被介质等措施,可提高黏附力度及结果的可信度。



图 17-11 黏附力测定的操作流程

将介质置于定量的培养液中并加入定量的细菌悬液,在适宜的条件下孵育后,用 KCl 缓冲液洗涤黏附介质 3~4 次,以除去附着在介质表面而非黏附的细菌。黏附量用放射性核素液体闪烁仪计数值,即每分钟闪烁计数(counts per minute,CPM)表示,黏附率(%)=(实验组 CPM-阴性对照 CPM/阳性对照 CPM-阴性对照 CPM)×100%

四、PCR 技术分析微生物菌落多样性

聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)是分子生物学中一种体外扩增特异性 DNA(或 RNA)片段的常规技术,近年来被广泛应用于口腔微生物研究中。应用范围包括微生物种属的鉴定、流行病学调查以及龋病、牙周病等常见感染性疾病的病因学研究,如毒性克隆基因等。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

PCR 采用碱基互补配对共价结合的原理，以待扩增的两条 DNA 链作为模板，由一对人工合成的寡核苷酸引物介导，以 dNTP 为底物，通过 DNA 多聚酶促反应于体外快速扩增特异性 DNA 序列，DNA 片段可扩增至百万倍以上。将扩增产物作凝胶电泳，即可分析结果。

变异链球菌是口腔的主要致龋菌。传统的分离培养和生化方法是鉴定变异链球菌等细菌的经典方法，但耗时费力，敏感性低。通过 PCR 技术扩增变异链球菌表面蛋白抗原 Ⅰ/Ⅱ 的编码基因 *Spap* 来检测变异链球菌，扩增出 192bp 的 DNA 片段，表兄链球菌和血链球菌则无扩增产物。PCR 能够检测的范围在 4～40CFU 之间。

对 50 个临床上分离的变异链球菌株和 13 个参考菌株进行检测，均为阳性，而对 41 种其他链球菌和非链球菌属细菌的检测均为阴性，*Spap* 的基因 PCR 是一种前景较好的快速检测变异链球菌的方法。PCR 技术可以直接用于牙菌斑生物膜中变异链球菌的测定和变异链球菌群的鉴别。

PCR 技术与核酸探针的有机结合，使其检测的敏感性大为提高。无放射活性的探针与 PCR 技术结合检测放线菌，与传统的单一探针方法相比，敏感性大大提高。

牙龈卟啉单胞菌和伴放线菌嗜血菌分别是成人牙周炎和青少年牙周炎特异的病原体，检测牙龈卟啉单胞菌和伴放线菌嗜血菌在牙周炎的预防、诊断和治疗上有重要意义。具核梭杆菌也在成人牙周炎和青少年牙周炎发病中发挥作用。16S rRNA 基因有高度保守性，但不同属、种细菌 16S rRNA 基因保守序列之间的变异区有差异，可通过 PCR 检测 16S rRNA 基因变异区来鉴定菌种。

用 PCR 扩增 16S rRNA 基因来检测龈下样品中的牙龈卟啉单胞菌和伴放线菌嗜血菌等 7 种口腔厌氧菌，发现该方法的检测下限为 50 个靶细胞，敏感性明显高于培养法，多套引物 PCR 检测龈下菌斑中牙龈卟啉单胞菌和伴放线菌嗜血菌的敏感性更高。PCR 进行 16S rRNA 基因、*prtC* 基因和 *fimA* 基因的检测，扩增的阳性率分别为 90.6%、81.9% 和 78.0%，具有较高的敏感性和特异性，可用于慢性牙周炎龈下标本中牙龈卟啉单胞菌的快速临床诊断。

以克隆杂交为“金标准”，比较用伴放线菌嗜血菌的白细胞毒素基因 *lktA* 引物的 PCR 和常规培养结合生化试验检测伴放线菌嗜血菌的敏感性和特异性，结果前者的敏感性和特异性分别为 65%、58%，后者为 89%、79%，PCR 是检测龈下菌斑中伴放线菌嗜血菌的首选方法。

具核梭杆菌在牙周炎、感染根管和牙周脓肿病灶中有很高的检出率。Blstad 首先确定了具核梭杆菌的相对分子质量为 4×10^4 的外膜蛋白基因（*fomA*）的序列，并用简单引物扩增出 *fomA* 基因 120bp 的产物。该 PCR 产物制备的探针能区分具核梭杆菌和其他梭杆菌以及其他牙周革兰阴性厌氧菌。

口腔致病微生物分型及与致病性关系的研究表明，根据 *fimA* 基因核苷酸序列的差可将牙龈卟啉单胞菌分为 Ⅰ～Ⅳ 型。选用不同的 *fimA* 引物分别进行 PCR 扩增，结果发现，Ⅱ 型 *fimA* 基因的牙龈卟啉单胞菌菌株在牙周炎患者中更多见，推测此型细菌与牙周炎的破坏性进展有关。

采用 AP-PCR 将伴放线菌嗜血菌临床菌株分为 14 种不同的基因型。Asikainen 等发现同一 AP-PCR 基因型的伴放线菌嗜血菌常属于同一血清型，属于血清型 b 的 AP-PCR 基因型的分布随宿主疾病状态而改变。不同血清型具有不同的基因型，而某些基因型伴放线菌嗜血菌与牙周疾病有关。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

五、DGGE 技术检测微生物菌落多样性

由于从环境样品中分离和培养细菌的困难，分子生物学方法已发展用来描述和鉴定微生物群落。近年来，基于 DNA 方法的群落分析得到了迅速的发展，如 PCR 扩增技术、克隆文库法、荧光原位杂交法、限制性酶切片段长度多态性法、变性和温度梯度凝胶电泳法，变性梯度凝胶电泳（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）已广泛用于分析自然环境中细菌、蓝细菌、古菌、微型真核生物、真核生物和病毒群落的生物多样性，这一技术能够提供群落中优势种类信息和同时分析多个样品，具有可重复和容易操作等特点，适合于调查种群的时空变化，并且可通过对切下的带进行序列分析或与特异性探针杂交分析鉴定群落成员。

DGGE 技术是一种以 PCR 为基础，用于微生物群落分析的方法。标记基因（基因中保守的和可变的区域，比如 16S rRNA）通过 PCR 扩增特定的微生物群落的 DNA 池而分离得到。不同序列的 PCR 产物的混合物应用 DGGE 技术，不同序列组成的 DNA 片段（GC 含量）将在不同的变性剂浓度变性，进而在凝胶上形成特定条带，形成条带模式。理论上来说，不同的条带代表群落里不同细菌的量。形成的图案反映了群落复杂的结构以及每个检测到的物种的相对丰度。

DGGE 分析微生物群落的一般步骤如下：①核酸的提取；②16S rRNA、18S rRNA 或功能基因如可溶性甲烷加单氧酶羟化酶基因（*mmoX*）和氨加单氧酶 α-亚单位基因（*amoA*）片段的扩增；③通过 DGGE 分析 PCR 产物，DGGE 使用具有化学变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶，该凝胶能够有区别地解链 PCR 扩增产物。

在 DGGE 中，具有相同长度但不同碱基对序列的 PCR 扩增 DNA 片段被分离开。DNA 片段加载于具有线性梯度变性剂甲酰胺和尿素的聚丙烯酰胺凝胶上，根据片段成分所含 G+C 的含量，DNA 双链在一定浓度的变性剂作用下变性。当片段达到第一溶解结构域时，其迁移被阻挡延缓。为防止双链完全解离，常在引物之一上加上一段高 GC 含量的片段，这个片段被称为 GC 钳（GC clamp）。当使用通用引物进行 PCR-DGGE 分析时，即可检测到未知的或不可培养的细菌。使用 PCR-DGGE 分析复杂微生物群落可得到条带谱，其中每一个条带代表一种不同的细菌。因此，可以使用 DGGE 研究微生物多样性或检测群体变化，DGGE 具有同时检测大范围多样本的优势。

由 PCR 产生的不同的 DNA 片段长度相同但核苷酸序列不同，因此不同的双链 DNA 片段由于沿着化学梯度的不同解链行为将在凝胶的不同位置上停止迁移，DNA 解链行为的不同导致一个凝胶带图案，该图案是微生物群落中主要种类的一个轮廓。DGGE 使用所有生物中保守的基因片段，如细菌中的 16S rRNA 基因片段和真菌中的 18S rRNA 基因片段。与其他分子生物学方法一样，DGGE 也有缺陷，其中之一是只能分离较小的片段，使其用于系统发育分析比较和探针设计的序列信息量受到了限制。在某些情况下，由于所用基因的多拷贝导致一个种类多于一条带，因此不易鉴定群落结构到种的水平。

该技术具有内在的如单一细菌种类 16S rDNA 拷贝之间的异质性问题，可导致自然群落中微生物数量的过多估计。DGGE 是分析微生物群落的一种有力的工具，不过为了减少 DGGE 和其他技术的缺陷，建议结合 DGGE 和其他分子及微生物学方法更能详细地观察微生物的群落结构和功能。

DGGE 广泛应用于分析环境微生物群落以及人类微生物生态学，如肠道和阴道内的微

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

生物菌群。DGGE 能够有效地用于评估与人类相关的微生物多样性以及监控特定的致病条件下微生物生态的变化。通过比较分析患者和健康人样本中的群落结构的不同，便于病原体识别。

DGGE 同样是一个用于分析人类龋病中的微生物的有效工具。用于调查人类唾液中的微生物多样性，研究相关的严重龋齿或牙髓感染和牙周炎的口腔细菌群落结构以及进行预防性治疗后口腔微生物的变化的评估。基于其广泛的特质，该方法有利于检测先前未知的对环境挑剔或者难以培养的微生物种，比传统的克隆方法省时省力。同许多其他的分子生物学方法一样，DGGE 有其局限性，如难以获得可重复的结果以及对群落的定量分析。然而，这是一个非常有用的用于人类口腔微生物的研究和分析的工具。

王人可等首次联合应用变性梯度凝胶电泳与其他微生物技术，对生理状态、病理状态以及外源因素作用下的口腔微生物组群进行系统性、群落性和差异性系列研究，建立人类口腔微生物组研究新方法。研究发现 DGGE 能有效检测生理状态下的人口腔微生物群。新方法结合了膜黏附法和 PCR-DGGE 技术的优势，能有效检测口腔细菌的相互黏附谱。该方法从混合微生物群落中鉴定出具有相互黏附作用的细菌对的有效性，大大增加了系统性研究群落内细菌间的相互结合的能力。DGGE 能有效检测人为调控状态下的人口腔微生物群。实验证实微量元素铁供不足可导致唾液菌群组成发生显著变化。铁供给不足的情况下，唾液菌群中感染性心内膜炎相关的 α 溶血细菌成为优势菌，增加了感染性心内膜炎的潜在风险。

六、原位荧光杂交技术（FISH）

荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization，FISH）是一种非常成熟的荧光标记方法，通过一个被荧光标记的特异性探针检测特定种属细菌的是否存在及其分布和生长的状况等，已经被广泛用于诊断和科研中。Pardue 和 John 研究小组在 1969 年建立原位杂交技术（ISH），在保持细胞形态完整的情况下，检测出细胞内特定的核酸序列，利用 DNA/RNA 探针，通过原位杂交将特定的 DNA/RNA 序列在细胞或染色体上标示出来。先后采用放射性核素标记以及荧光酶、地高辛、生物素等荧光物质标记，形成了荧光原位杂交（FISH）技术，能够同时检测不同的探针，出现多重原位杂交。1988 年，Giovannon 等首次将 FISH 技术引入细菌学研究。1989 年，Delong 首次使用荧光标记寡核苷酸探针检测单个微生物细胞。近几年，FISH 技术由于其灵敏、快速、使用安全、特异性好等特点，已经成为医学、生态学、遗传学、环境微生物学研究的有力工具。

FISH 的基本原理是用已知的荧光信号分子标记单链核酸（一般为 DNA）为探针，按照碱基互补的原则，与待检样品中未知的单链核酸进行结合，形成可被检测的杂交双链核酸。细菌学常用的 FISH 是以 16S RNA 为靶点，不同探针可以特异性标记不同种属的细菌细胞。实验时要用交联剂先将样品固定，然后加入探针，并使探针在适当的条件下和目标的 DNA 或 RNA 杂交，之后再洗去非特异性杂交的探针。由于 DNA 与 RNA 杂交时会产生静电排斥，两者结合的强度会被减弱，因此人们在 FISH 探针上进行了诸多改进，肽核酸探针是其中应用广泛的一种。它是寡核苷酸的模拟物，它的糖-磷酸骨架被不带电的 N-（2-氨基乙基）甘氨酸骨架所代替。尽管肽核酸在结构上相对寡核苷酸有了显著的改变，但其与互补核酸之间的结合仍遵循碱基互补配对原则，肽核酸为模板的探针具备了一些单链核酸探针无法比

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

拟的特性，比如：比天然核苷酸具有更高的亲和力；有较强的抗核酸酶和蛋白水解酶降解的能力等。

以 rRNA 为标记的荧光原位杂交寡核苷酸探针方法的引进，促使微生物的识别不再依赖营养物培养，标志着环境和医学微生物学新时代的开始。收集到 rRNA 全周期序列，微生物学家采用定量的方式通过 FISH 破译完整的微生物群落结构。此外，该染色技术简单易行，当设计和评估好探针后，环境或医学样本中的目标生物在几个小时内就可以完成检测。起初，FISH 仅仅是单一标记寡核苷酸探针的荧光，由于此技术在含核糖体少的细胞内信号强度很低，因此 FISH 在营养匮乏的环境中检测效率相当低。针对此系统，FISH 催化信使沉积法[catalyzed reporter deposition（CARD）-FISH]通过辣根过氧化物酶[horseradish peroxidase（HRP）-labeled oligonucleotide]标记的寡核苷酸探针和酪胺信号放大的方法捕捉大多数微生物群落成员。

rRNA 标记的 FISH 技术不断深入发展，增强了细胞的通透性，探测目标位点的便利性、探针特异性以及信号强度等方面得以重大改进。FISH 相关的迅速发展的研究方向，主要是 rRNA-FISH 同其他技术的联用提供了额外的信息，如：①靶细胞特定基因或 mRNA 分子的存在；②特定的代谢活动；③环境参数的重要性，如检测到的周围化合物的浓度等。目前，rRNA-FISH 和 CARD-FISH 已经同许多其他的技术或者染色方法联用，显微放射自显影术（micro-autoradiography）、微电极测量（microelectrode measurements）、拉曼显微光谱学（Raman microspectroscopy）以及纳米次级离子质谱（NanoSIMS），逐渐形成了从单色到多色、从中期染色体到粗线期染色体再向 DNA 纤维的发展趋势，灵敏度和分辨率也大大提高，FISH 技术还与其他技术相结合，为环境微生物的研究提供更多信息。随着技术的不断进步，FISH 的准确性和灵敏度将进一步提高，必将在口腔微生物生态学研究领域得到更加充分的应用。

第二节　口腔微生物宏基因组学研究

健康人的口腔中包含有超过 700 种不同的细菌、病毒和真菌等微生物物种，它们被称为口腔微生物群落，定植于口腔中很多独特的微生物生境，例如牙、龈沟、附着龈、舌、颊、唇、硬腭、软腭以及与口腔邻近的部位如扁桃体、咽、食管、咽鼓管、中耳、气管、肺、鼻腔和鼻窦，各微生物生境中的共生体基因组被定义为微生物组。

Joshua Lederberg 等最先提出人类微生物组（microbiome）的概念，是指在人体内或者表面存在的生态群落中共生、共栖和致病的微生物的总称。人类口腔微生物组（oral microbiome）为所有在人体口腔以及口腔邻近部位微生物生境中共生、共栖和致病的微生物群落的总称。

一、口腔微生物组与宏基因组学

研究发现，不同口腔组织和结构定植了不同的微生物群落。在口腔 700 多种常见的口腔菌种中，大约有 280 种细菌已经从口腔中分离培养并被命名，但只有不到 1/2 的菌种可以在目前的微生物培养条件下培养。通过非培养依赖性分子分析方法，特别是基于 16S rRNA 的宏基因组学分析，已经被证实有用并鉴定了大约 700 种口腔中的菌种或表型。

宏基因组（metagenome），也称环境微生物基因组或元基因组，其定义为“the genomes of

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

the total microbiota found in nature"，即生境中全部微生物遗传物质的总和。它包含了可培养的和不可培养的微生物的基因，目前主要指环境样品中的细菌和真菌的基因组总和。

宏基因组学(metagenomics)是由 Handelsman 等于 20 世纪 90 年代提出的一门应用学科，是一种以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象，以功能基因筛选和(或)测序分析为研究手段，宏基因组学通过非培养方法进行微生物群落组成的鉴定，主要流程包括 DNA 的提取、文库的构建和目标基因克隆的筛选以及宏基因组高通量测序，可用于发现新基因、开发新的生物活性物质、研究群落中微生物多样性以及基因组成与功能预测等。

宏基因组学是研究微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及其与环境之间的新的微生物研究方法。迄今为止，其研究对象已从最初的土壤微生物发展到水体浮游微生物、海底沉积物、空气悬浮物、动植物体附生微生物以及人体相关的皮肤、肠道和口腔等表面常驻微生物。由于自然界的微生物物种多样性极其丰富，其中 99% 以上的微生物尚无法在现有实验室条件下进行培养，所以利用宏基因组技术来研究那些大量未知的微生物基因序列，突破了传统微生物研究的瓶颈，将很有可能改变人们对微生物世界的传统认识，并将在医药领域有巨大的应用潜力。

二、基因芯片技术

基因芯片(gene chip，DNA chip)，又称寡核苷酸阵列或 DNA 微阵列(DNA microarray)，这一技术方法在 1991 年的 *Science* 杂志上被首次提出，是生物芯片(biochip)的一种。这种技术在固相载体上很小面积内按照预定位置固定了千万个核酸分子所组成的微点阵阵列。在一定条件下，载体上的核酸分子可以与来自样品的序列互补的核酸片段杂交。如果把样品中的核酸片段进行标记，在专用的芯片阅读仪上就可以检测到杂交信号。

基因芯片与传统的核酸检测技术相比，使用玻片等载体的基因芯片用于环境微生物研究具有更多优势：第一，以 DNA 为基础的基因芯片技术是研究功能基因组学的有力工具，全面地研究不同条件下活细胞的生理学；第二，基因芯片技术不需要知道保守序列，不同种群的同一功能组的所有多态性基因序列可以构建在芯片上，并且以此作为探针来检测它们在环境样品中的相应分布；第三，不需要枯燥费时的配对杂交；第四，基因芯片需要的样品量少，适宜于环境微生物检测；第五，基因芯片具有定量特性。在基因芯片技术面市的 20 多年时间里，它的研究和应用取得了巨大的进步，基因芯片技术在发现新基因、基因表达测定、突变检测、基因多态性、基因组文库作图、临床诊断、新药筛选等领域得到了广泛应用。

根据探针排列的类型，可以将用于环境研究的基因芯片主要分为 4 类。一类是含有系统标记基因如核糖体核酸(rRNA)基因探针的系统发育的寡核苷酸芯片(phylogenetic oligonucleotide arrays，POAs)，该芯片主要是用于微生物群落组成和结构的系统发育分析。

原核生物的 5S rRNA，16S rRNA 和 23S rRNA 位于同一操纵子上，是研究细菌进化和亲源关系的重要指标，其中，16S rRNA 是细菌群落结构分析最常用、系统进化最有用和最常用的靶分子。16S rRNA 序列全长约 1540bp，其基因由可变区和保守区组成，可变区一般包含(V1～V9)共 9 个可变区域，可变区能在不同菌种之间表现出足够的多态性，揭示生物物种的特征核酸序列，是细菌属种鉴定的分子基础，能用于细菌非常精确的分类鉴定，从而使菌群结构的分析可以达到很高的分辨度水平，而保守区能反映细菌之间的亲缘关系，为细菌的系统进化重建提供了线索，同时也为 PCR 技术中的引物以及生物芯片技术中的探针设计提

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

供了序列基础。

第二类是功能基因芯片(functional gene arrays,FGAs),功能基因芯片着重分析微生物群落功能结构,通常建立在催化生化反应的关键功能基因之上,这些基因包括了那些与研究对象有确定关系的基因,或至少是与研究对象的关系有待考证的基因,他们参与编码了不同生物化学循环过程中的关键酶和其他功能基因序列,涉及碳、氮和硫循环以及能量代谢平衡、抗生素抗性、金属抗性、噬菌体、应激、毒力、氨基酸合成和运输、脂肪酸生物合成和代谢、碳水化合物合成和代谢等多个范畴功能基因。该技术可以用于检测自然环境中微生物群落的生理状态和功能活动。

根据 FGAs 的目的及其杂交靶标的种类,FGAs 分为功能分类基因芯片和基因表达芯片,前者的目的主要是研究菌群是否具有这些特定反应过程及其功能的分布、变化、多样性,其杂交靶标是菌群 DNA 的 PCR 产物;而后者用于研究这些特定功能基因的生理活性及其基因表达情况,需提取环境样品的 mRNA,其杂交靶标是菌群 cDNA 的 PCR 产物。

第三类是含有整个 DNA 基因组的群落基因组芯片(community genome arrays,CGAs),该技术将可培养微生物的全基因组 DNA 作为探针,根据可培养的成分描述未知微生物群落结构,特异性高,可以鉴定到种甚至菌株水平;敏感性高,只需 0.2ng 的待分析基因组 DNA 就可检测。

第四类是宏基因组芯片(metagenomic array,MGA),宏基因组芯片是一种将芯片技术和宏基因组技术结合起来的高通量文库筛选新技术,该技术无需分离培养菌株,无需了解菌群的基因序列,通过构建环境 DNA 的宏基因组文库即可获得探针,一般来说,探针来源于环境 DNA 的宏基因组文库,通过大肠埃希菌作为宿主来构建,MGA 所包含的探针为 1kb 左右。该技术可以分析环境样品微生物结构和功能,可以通过不同环境样品宏基因组芯片的比较分析获得某环境样品菌群的代表 DNA 探针,因此在环境方面将具有巨大的应用价值。

目前未培养微生物组成了地球上生物多样性的主体,据估计,自然环境中超过 99% 的微生物不能用传统的方法进行纯培养,环境样品中微生物基因组的功能和序列分析需要通过非培养的技术即宏基因组或直接从环境样品中抽提克隆微生物的混合 DNA 来研究,MGA 技术仍在发展初期。

2008 年,美国哈佛大学 Forsyth 牙科中心的 Paster 教授研究小组首次将基于 16S rRNA 的 300 种常见口腔细菌的种属特异性探针(包括不可培养的细菌)固定于固相支持物上,并使用它与标记处理后的样品进行原位杂交,然后根据杂交信号的强度和分布情况分析口腔样品中微生物群落结构。该研究小组成功开发出了可分析约 300 种常见口腔细菌的商品化寡核苷酸芯片,并将其命名为人类口腔微生物芯片(human oral microbe identification microarray,HOMIM),有效性已被诸多研究证实。寡核苷酸基因芯片技术具有高精确度和高灵敏度分析等显著特征,同其他杂交技术一样,探针的设计是以已有的序列为基础的,因而容易忽略新的基因。可用于比较疾病和健康状态下的微生物构成、监测治疗对口腔微生物构成的影响等。目前,国内外已有学者将其应用于各种口腔疾病相关的微生物多样性的检测以及正常人口腔多个部位的微生物多样性的检测中。

(一）牙周病微生物多样性检测

Colombo 等学者通过使用 HOMIM 芯片对 47 例患牙周炎(17 例难治性牙周炎和 30 例可治性牙周炎)的受试者以及 20 例牙周健康受试者的龈下菌斑检测发现,牙周健康受试者中

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

更常见的是放线菌(*Actinomyces* sp. OT 170)、*Actinomyces spp.* cluster Ⅰ、生痰二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga sputigena*)、人类心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、*Lautropia mirabilis*、丙酸丙酸杆菌(*Propionibacterium propionicum*)、黏滑罗斯菌(*Rothia dentocariosa/mucilaginosa*)以及血链球菌(*Streptococcus sanguinis*)。

患牙周炎的受试者可以检测到更多的菌种,难治性牙周炎受试者中检测到了更高频率的牙周可疑致病菌,如微小小单胞菌(又名微小消化链球菌 *Parvimonas micra*)、纤细弯曲菌(*Campylobacter gracilis*)、缠结优杆菌(*Eubacterium nodatum*)、有害月形单胞菌(*Selenomonas noxia*),福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*),牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、普雷沃菌属菌种(*Prevotella spp.*)、螺旋体属菌种(*Treponema* spp.)、啮蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)以及一些不常见菌种如 *Pseudoramibacter alactolyticus*、TM7 spp. 等。

难治性牙周炎患者龈下菌斑的菌群分布与可治性牙周炎患者和牙周健康者明显不同。通过牙周治疗后大部分检测到的菌种会减少,但是只有少数的微生物显著减少,在可治性牙周炎受试者中显著减少,但是在难治性牙周炎受试者中增加或者仍然占高比例的细菌包括拟杆菌种(*Bacteroidetes sp.*)、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、普雷沃菌属菌种(*Prevotella spp.*)、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)、小杆菌属菌种(*Dialister spp.*)、新月形单胞菌属菌种(*Selenomonas spp.*)、疾病卡托菌属(*Catonella morbi*)、真杆菌属菌种(*Eubacterium spp.*)、*Filifactor alocis*、微小小单胞菌(*Parvimonas micra*)、消化链球菌属(*Peptostreptococcus sp.* OT113)、梭杆菌属(*Fusobacterium sp.* OT203)、*Pseudoramibacter alactolyticus*、中间链球菌(*Streptococcus intermedius*)、星座链球菌(*Streptococcus constellatus*)以及 *Shuttlesworthia satelles*。

然而,生痰二氧化碳嗜纤维菌(*Capnocytophaga sputigena*)、人类心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)、溶血孪生球菌(*Gemella haemolysans*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、*Kingella oralis*、*Lautropia mirabilis*、长奈瑟菌(*Neisseria elongata*)、龋齿罗斯菌(*Rothia dentocariosa*)、澳大利亚链球菌(*Streptococcus australis*)这些细菌与治疗过程相关。因此,这些典型牙周致病菌的持续存在以及有益菌的减少与慢性难治性牙周炎有关。

Albandar 等学者使用 HOMIM 芯片对 13 例掌跖角化-牙周破坏综合征(Papillon-Lefèvre syndrome,PLS)患者的龈下菌斑进行分析,结果发现,总共检测出 170 种细菌,每个 PLS 患者 40~80 种,有 12 种细菌在至少 1/2 的 PLS 患者中有中到高度的检出率,检出最频繁的细菌隶属于 8 个组,伴放线菌聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、弯曲菌属菌种(*Campylobacter spp.*)、颗粒二氧化碳噬纤维菌(*Capnocytophaga granulosa*)、溶血孪生球菌(*G. morbillorum*)、微小小单胞菌(*P. micra*)、牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*)、链球菌属菌种(*Streptococcus spp.*)以及福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)。

Olson 等学者使用 HOMIM 芯片对 12 名西弗吉尼亚居民的龈下菌斑分析后发现,患口腔疾病少的组检测到高频率的韦荣菌属菌种(*Veillonella*)和链球菌属菌种(*Streptococcus*),中等频率的二氧化碳噬纤维菌属菌种(*Capnocytophaga*)。而患口腔疾病多的组梭菌属菌种(*Clostridiales*)、新月形单胞菌属菌种(*Selenomonas*)、优杆菌属(*Eubacterium*)、小杆菌属菌种(*Dialister*)细菌的检出率显著增加。

Preza 使用 HOMIM 芯片对没有患根面龋的老年人的舌背、颊黏膜、硬腭、健康牙根面龈上菌斑以及龈下菌斑进行分析,发现了 175 种细菌,分属于 8 个类群,在所有部位都可以检测到链

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

球菌属菌种（*Streptococcus*）、韦荣菌属菌种（*Veillonella*）、梭杆菌属菌种（*Fusobacterium*），细菌多样性在颊部和腭部最高，几乎没有检测到与龋病和牙周病相关致病菌。

（二）在龋病微生物多样性检测

Preza 等学者通过 HOMIM 芯片对 20 例健康老年受试者和 21 例患根面龋老年受试者的龈上菌斑检测，总共发现了 179 种细菌，健康受试者的菌群多样性要高于患根面龋受试者。大部分患根面龋受试者与干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）、副干酪乳杆菌（*paracasei*）、鼠李糖乳杆菌（*rhamnosus*）和 *Pseudoramibacter alactolyticus* 有关，变异链球菌（*Streptococcus mutans*）在感染的牙本质中检出频率远高于其他样本，而放线菌属菌种（*Actinomyces*）在健康受试者中检测频率更高。因此，除放线菌属菌种（*Actinomyces*）和变异链球菌（*S. mutans*）以外的致病菌可能在根面龋的发生中起了作用。

罗爱华等使用 HOMIM 芯片对 20 例 6～8 岁的无龋儿童以及 30 例龋活跃儿童的唾液分析，结果发现 94 种细菌分别隶属 6 个细菌类群和 30 个属，龋活跃者的细菌多样性高于健康者，8 种细菌在龋活跃者中检出更频繁，它们分别是拟杆菌门菌种（*Bacteroidetes*[*G-2*] sp_ot274）、生痰二氧化碳嗜纤维菌（*Capnocytophaga sputigena*_ot775）、坦纳菌属菌种（*Tannerella* sp_ot286）、昭和弯曲菌属菌种（*Campylobactershowae*_ot763）、弯曲菌属菌种（*Campylobacter* Cluster Ⅰ_ot580_748_763）、损伤月形单胞菌（*Selenomonas infelix*_ot126）、微小小单胞菌（*Parvimonas micra*_ot111）以及（*Leptotrichia hofstadii*_ot224）。然而，6 种细菌在健康者中检出更频繁，它们是溶血孪生球菌（*Gemella haemolysans*_ot626）、苛养颗粒链菌（*Granulicatella elegans*_ot596）、*Streptococcus infantis* sp clone FN042_ot065_638、缓症链球菌（*Streptococcus mitis bv*2 和 sp clone FP064_ot069_398）、链球菌属菌种（*Streptococcus* sp clone F0042_ot067）以及龋齿罗斯菌（*Rothia dentocariosa*_ot587）。

Tanner 等使用 HOMIM 芯片对 2～6 岁儿童的菌斑进行分析，12 个月后进行复查，结果发现，相对于无龋者，与严重早期儿童龋相关的细菌包括 *Slackia exigua*、副血链球菌（*Streptococcus parasanguinis*）、普雷沃菌属菌种（*Prevotella sp.*）。复诊时，没有新发龋损的儿童变异链球菌（*S. mutans*）检出率低，*S. wiggsiae* 和 *S. exigua* 与龋损的发展有关，成功的治疗会伴随微生物群落的变化，但是早期儿童龋还受饮食的影响。

Torlakovic 等学者采用纵向队列研究，对因正畸原因需拔出的牙齿表面的白垩斑的微生物群落使用 HOMIM 芯片分析，了解了龋病发展过程中微生物群落的动态演变过程，当实验开展 7 周后，75% 的牙面形成了白垩斑，其中的微生物群落构成与健康牙面的群落明显不同，25 种细菌与健康牙面密切相关，包括变异链球菌（*Streptococcus mutans*）、短小奇异菌（*Atopobium parvulum*）、*Dialister invisus*、普雷沃菌属菌种（*Prevotella*）和斯卡多维亚氏菌属菌种（*Scardovia*）。反之，14 种细菌与健康釉质密切相关，包括梭杆菌属菌种（*Fusobacterium*）、弯曲菌属菌种（*Campylobacter*）、金氏菌属菌种（*Kingella*）和二氧化碳噬纤维菌属（*Capnocytophaga*）。

（三）在其他口腔微生物多样性检测中的应用

Docktor 等通过 HOMIM 芯片对健康受试者、溃疡性结肠炎以及克罗恩病的舌黏膜和颊黏膜拭子分析，结果发现，相比健康受试者，克罗恩病受试者的舌黏膜拭子微生物多样性显著降低，尤其是梭杆菌属菌种（*Fusobacteria*）和厚壁菌属菌种（*Firmicutes*）有明显的改变，而溃疡性结肠炎受试者的拭子微生物多样性与健康受试者无显著差别。Lif Holgerson 等对 25

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

例顺产和38例剖宫产婴儿的口腔微生物群落进行分析，结果发现，*Slackia exigua* 只能在剖宫产的婴儿中检测到，相比剖宫产的婴儿检测的菌种（54种），在顺产的婴儿中可以发现更多的菌种（79种），通过多元统计分析发现它们之间可以分开。

Ahn 等通过 HOMIM 芯片和454测序对20例成人口腔唾液进行比较分析，结果发现，两种方法检测主要的类群，如厚壁菌属（*Firmicutes*）、变形菌属（*Proteobacteria*）、拟杆菌属（*Bacteroidetes*）、放线菌属（*Actinobacteria*）、梭杆菌属（*Fusobacteria*）有很高的相关性，454测序发现77种细菌，而 HOMIM 芯片发现49种细菌，其中37种细菌两种方法都能检出，两种方法都能同时检出的常见的细菌如变异链球菌属菌种（*Streptococcus*）、韦荣菌属菌种（*Veillonella*）、纤毛菌属菌种（*Leptotrichia*）、普雷沃菌属菌种（*Prevotella*）、嗜血杆菌属菌种（*aemophilus*）。

Farrell 等使用 HOMIM 芯片对10名患有可切除胰腺癌的受试者和10名健康对照者的唾液微生物群进行分析，结果发现，相对健康组，患胰腺癌患者组中有31种细菌增加，25种细菌减少。

三、下一代测序技术

DNA 测序技术自面世以来就一直在推动着生物学和医学的发展，自从英国生物化学家 Frederick Sanger 在1977年首先建立"DNA 双脱氧链末端终止测序法"以来，已过去35年了。在这过去的35年中，DNA 测序技术取得了令人瞩目的进展。从早期的手工测序以及基于 Sanger 法开发的第1代自动化测序仪，到目前的下一代测序平台，这一领域已经发生了翻天覆地的变化，测序通量（测序数据量）大幅提升，而每个碱基的测序成本大幅下降。本小节将简要介绍测序技术的发展历程以及下一代测序技术。

（一）第一代测序技术

第一代测序技术主要包括两种代表性的测序方法，一种是由 Sanger 和 Coulson 在1977年开创的"DNA 双脱氧链末端终止测序法"，另一种是由 Maxam 和 Gilbert 在1977年发明的"DNA 化学降解法"。虽然其原理不同，但这两种方法都是通过生成互相独立的若干组带放射性标记的寡核苷酸，每组寡核苷酸都有固定的起点，但却随机终止于特定的一种或者多种残基上。由于 DNA 上的每一个碱基出现在可变终止端的机会均等，因此上述每一组产物都是一些寡核苷酸混合物，这些寡核苷酸的长度由某一种特定碱基在原 DNA 全片段上的位置所决定。然后通过在可以区分长度仅差一个核苷酸的不同 DNA 分子的条件下，对各组寡核苷酸进行电泳分析，只要把几组寡核苷酸加样于测序凝胶中若干个相邻的泳道上，即可从凝胶的放射显影片上直接读出 DNA 上的核苷酸顺序。

1. Sanger 测序法　是在加减法序列测定技术（Sanger 和 Coulson，1975）的基础上发展而来的。根据核苷酸在某一固定的点开始，随机在某一个特定的碱基处终止，并且在每个碱基后面进行荧光标记，产生以 A、T、C、G 结束的4组不同长度的一系列核苷酸，在尿素变性的 PAGE 胶上电泳进行检测，可获得可见的 DNA 碱基序列。Sanger 法测序的原理就是：每个反应含有所有4种脱氧核苷酸三磷酸（dNTP）使之扩增，并混入限量的一种不同的双脱氧核苷三磷酸（ddNTP）使之终止。由于 ddNTP 缺乏延伸所需要的3′-OH 基团，使延长的寡聚核苷酸选择性地在 G、A、T 或 C 处终止，终止点由反应中相应的双脱氧而定。

每一种 dNTPs 和 ddNTPs 的相对浓度可以调整，使反应得到一组长度为几个至几千个碱

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

基的链终止产物。它们具有共同的起始点，长度相差为一个碱基，但终止在不同的核苷酸上，通过高分辨率变性凝胶电泳分离大小不同的片段，凝胶处理后可用X-线胶片放射自显影或非放射性核素标记进行检测。Sanger测序法原理示意图见图17-12。Sanger法是目前最常用的方法，也称酶法。Sanger也因此第2次获得1980年的诺贝尔化学奖，第1次是因为测定胰岛素的氨基酸序列。在1977年，Sanger测定了第一个基因组序列，是噬菌体X174的，全长5375个碱基。他发明的Sanger测序法第一次为科研人员开启了深入研究生命遗传密码的大门。

例：-GATCCGAT-。

在第一个反应系统中产生的都是以A结尾的片段：GA，GATCCGA。

在第二个反应中产生的都是以C结尾的片段：GATC，GATCC。

在第三个反应中产生的都是以G结尾的片段：G，GATCCG。

在第四个反应中产生的都是以T结尾的片段：GAT，GATCCGAT。

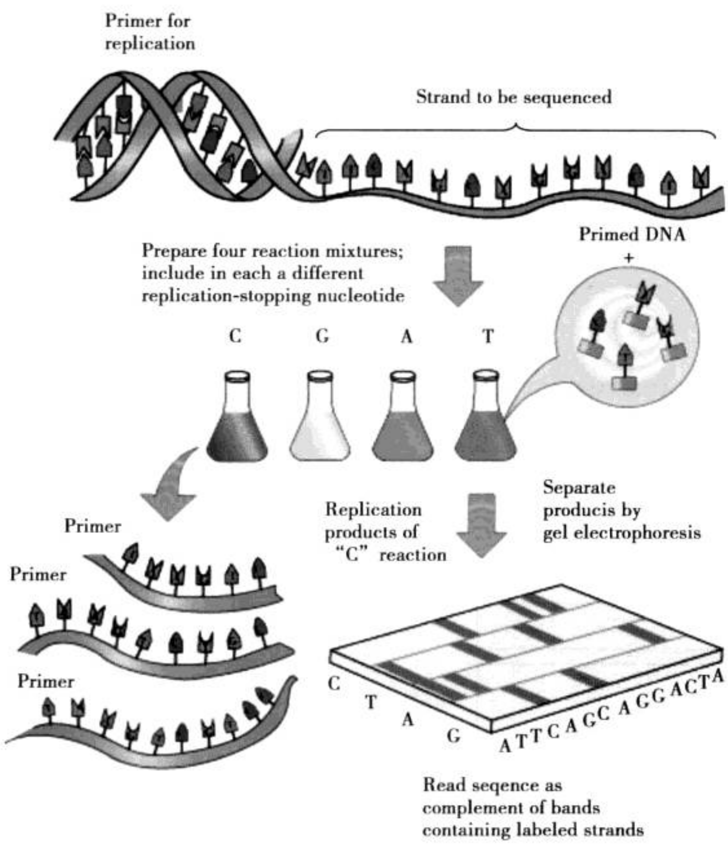


图17-12　Sanger测序法示意图

注：单链DNA通过荧光标记的双脱氧核苷三磷酸（ddNTPs）扩增后得到不同片段大小的链终止产物，然后通过变性凝胶电泳分离大小不同的片段，最后通过激光和计算机处理凝胶显影图像后读出序列。图片来自：GENOME PROJECTS：UNCOVERING THE BLUEPRINTS OF BIOLOGY，（http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/sequencing2.gif）图1

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

电泳时按分子量大小排列，A 反应的片段长度为 2 和 7；C 反应的为 4 和 5；G 反应的为 1 和 6；T 反应的为 3 和 8。

Sanger DNA 测序技术经过 30 多年的不断发展与完善，现在已经可以对长达 1000bp 的 DNA 片段进行测序了，而且对每一个碱基的读取准确率高达 99.999%。后来出现的四色荧光 Sanger 测序法（每一种荧光代表 4 种碱基中的一种）被用在自动毛细管电泳测序系统中，此系统由应用生物系统有限公司（Applied Biosystems Inc.）推上市场，后来该公司被整合入生命技术公司（Life Technologies）和贝克曼考尔特公司（Beckman Coulter inc.）。发表于 2001 年的第一个人类基因组复合序列就是主要由毛细管电泳测序系统来测定完成的，不仅耗资庞大，花费人力无数，而且历时超过十年。在现在的高通量基因组鸟枪法测序操作当中，使用 Sanger 测序法的费用大约为 0.5 美元/1000 个碱基。

2. Maxam-Gilbert DNA 化学降解法　化学降解法与包括合成反应的链终止法不同，需要对原 DNA 进行化学降解。其基本原理是：首先对待测 DNA 末端进行放射性标记，再通过 5 组（也可以是 4 组）相互独立的化学反应分别得到部分降解产物，其中每一组反应特异性地针对某一种或某一类碱基进行切割。因此，产生 5 组（或 4 组）不同长度的放射性标记的 DNA 片段，每组中的每个片段都有放射性标记的共同起点，但长度取决于该组反应针对的碱基在原样品 DNA 分子上的位置。此后各组反应物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，通过放射自显影检测末端标记的分子，并直接读取待测 DNA 片段的核苷酸序列。

化学降解法测序原理如图 17-13 所示。相对而言，化学降解法自初次提出以来，基本没有变化。虽然设计了另一些化学降解反应，但这些反应一般只作为化学降解法最早提出的反应的补充。由于种种原因（如采用 ^{32}P 进行放射性标记、末端标记 DNA 的比活度、裂解位点的统计学分布、凝胶技术方面的局限性等等），化学降解法所能测定的长度要比 Sanger 测序法短一些，它对放射性标记末端 250 个核苷酸以内的 DNA 序列效果最佳。

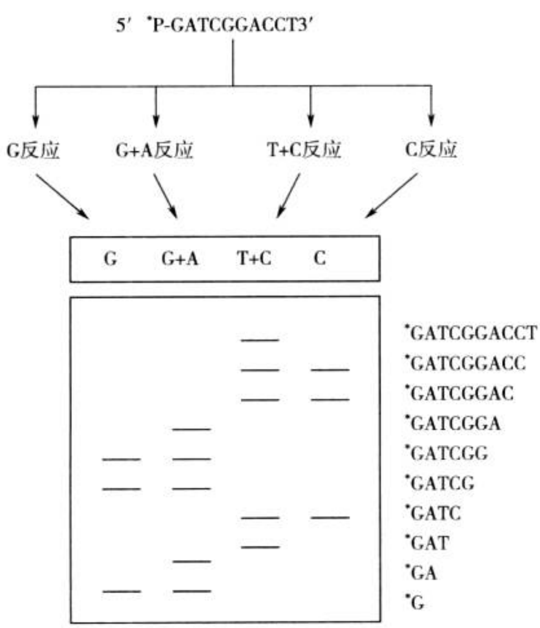


图 17-13　化学降解法测序原理

化学降解法较之链终止法具有一个明显的优点就是所测序列来自原 DNA 分子而不是酶促合成所产生的拷贝。因此，利用化学降解法可对合成的寡核苷酸进行测序，可以分析诸如甲基化等 DNA 修饰的情况，不可以通过化学保护及修饰干扰实验来研究 DNA 二级结构及蛋白质与 DNA 的相互作用。Sanger 法由于既简便又快速，而成为目前的最佳选择方案。目前大多数测序策略都是基于 Sanger 法而设计的。

（二）下一代测序技术

随着人类基因组计划的完成，人们

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

进入了后基因组时代，即功能基因组时代，传统的测序方法已经不能满足深度测序和重复测序等大规模基因组测序的需求，这促使了下一代 DNA 测序技术的诞生。下一代测序技术（next-generation sequencing，NGS），也称为第二代测序技术或者称为高通量测序技术（high-throughput sequencing），主要是相对于传统的 Sanger 测序而言的。它最显著的特征是能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定，但是一般读长较短。

一般来说，下一代测序技术的技术路线主要分以下几个步骤：首先将片段化的基因组 DNA 两侧连上接头，随后用不同的方法产生几百万个空间固定的 PCR 克隆阵列。每个克隆由单个文库片段的多个拷贝组成。然后进行引物杂交和酶延伸反应。由于所有的克隆都在同一平面上，这些反应就能够大规模平行进行，每个延伸反应所掺入的荧光标记的成像检测也能同时进行，从而获得测序数据。DNA 序列延伸和成像检测不断重复，最后经过计算机分析就可以获得完整的 DNA 序列信息。

目前，下一代测序技术的主要平台代表有 Roche 公司基于焦磷酸测序原理的 454 测序仪（GS Junior，GS FLX sequencer）、Illumina 公司基于合成测序原理的 Solexa 基因组分析仪（Genome Analyzer IIx，HiSeq 2000/MiSeq）和 ABI 公司基于连接技术的 SOLiD 测序仪（SOLiD sequencer）。第二代测序技术实现了高通量、高效率、高准确度的测序并大大降低了测序的成本。本节介绍 3 种平台测序技术的原理以及优缺点。

1. Roche 454 测序技术　454 测序技术的原理是通过焦磷酸盐测序原理与微流体技术的整合。它是一种新的依赖生物发光进行 DNA 序列分析的技术，在 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶的协同作用下，将引物上每一个 dNTP 聚合与一次荧光信号释放偶联起来，通过检测荧光的释放和强度，达到实时测定 DNA 序列的目的。此技术不需要荧

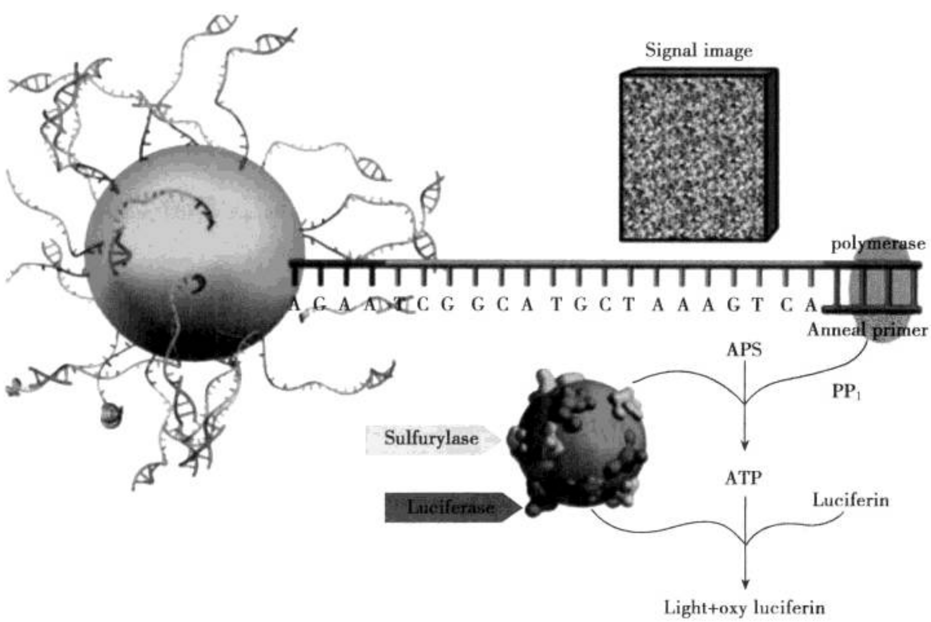


图 17-14　454 测序技术原理

注：图片来自：Pyrosequencing chemistry，（http://454.com/img/content/technology-slide-7.jpg）图 6

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

光标记的引物或核酸探针，也不需要进行电泳，具有分析结果快速、准确、灵敏度高和自动化的特点。454 测序技术的原理示意图见图 17-14。454 测序的一般流程为以下 4 个步骤，如图 17-15 所示：

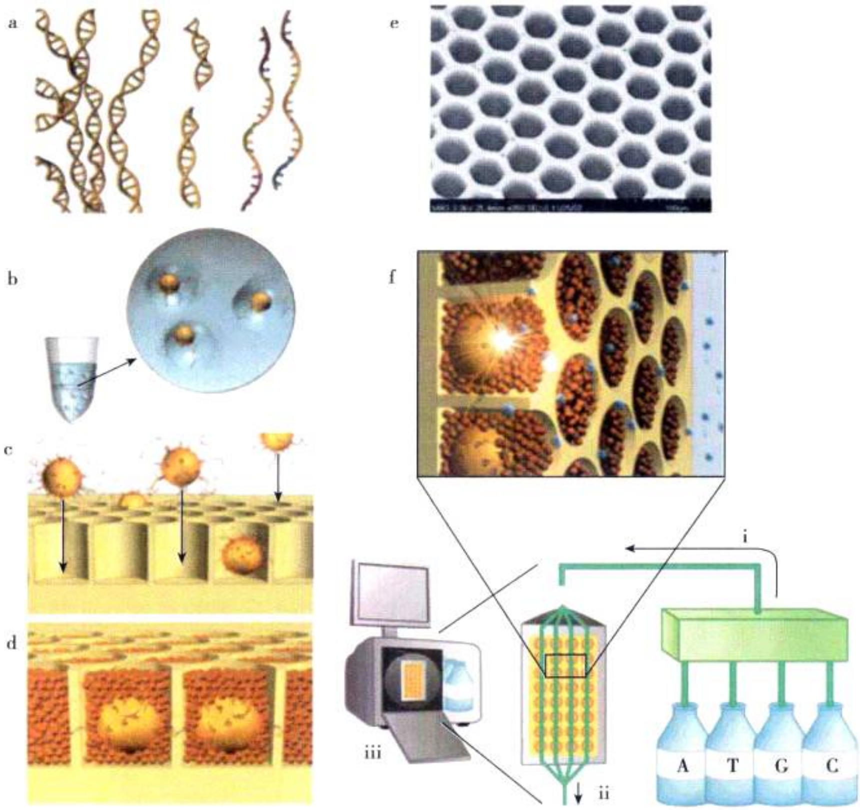


图 17-15　454 测序流程

注：该图片来自：Rothberg J M，Leamon J H. The development and impact of 454 sequencing. *Nature biotechnology*，2008，26(10)：1119. 图 2

（1）文库制备：根据样品的种类和实验目的，将基因组 DNA/cDNA 打断为 400～800bp 间片段，经末端修复与特异性接头连接等修饰后，变性处理回收单链的 DNA(sstDNA)；短的 PCR 产物则可利用特殊融合引物扩增后直接进行下一个步骤。

（2）乳液 PCR(emulsion PCR，em-PCR)：特定比例的单链 DNA 文库被固定在特别设计的 DNA 捕获磁珠上，使大部分磁珠携带了一个独特的单链 DNA 片段。磁珠结合的文库被扩增试剂乳化，形成油包水的混合物，每个独特的片段在自己的微反应器里进行独立的扩增，而不受其他的竞争性或者污染性序列的影响。整个片段文库的扩增平行进行。扩增后产生了几百万个相同的拷贝。随后，乳液混合物被打破，扩增后仍结合在磁珠上的片段即可被回收纯化用于下一步的测序实验。

（3）测序反应：携带 DNA 的珠子与其他反应物混合物，随后放入一种称为"Pico Titer Plate"(PTP)的平板中进行后继的测序，PTP 板中含有 160 多万个激光蚀刻的微孔，每个 PTP

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

孔的直径(29μm)只能容纳一个珠子(20μm)。孔中载有化学发光反应所需的各种酶和底物。最后将 PTP 板放置在 GS FLX 测序仪中,测序开始。每一个与模板链互补的核苷酸的添加都会产生化学发光的信号,并被 CCD 照相机所捕获。

(4) 数据分析:GS FLX 系统在 10 小时的运行当中可获得 100 多万个读长,读取超过 4 亿~6 亿个碱基信息,通过 GS FLX 系统提供的不同的生物信息学软件对测序数据进行分析。

2. Illumina Solexa 测序技术　Illumina 测序技术的原理也是基于焦磷酸测序的单分子阵列测试(genotyping),采用边合成边测序(sequencing by synthesis,SBS)的技术,可在一个反应中同时加入 4 种荧光标记核苷,在每个循环过程里,荧光标记的核苷和聚合酶被加入到单分子阵列中。

互补的核苷和核苷酸片段的第一个碱基配对,通过酶加入到引物上。多余的核苷被移走。这样每个单链 DNA 分子通过互补碱基的配对被延伸,利用生物发光蛋白,如萤火虫的荧光素酶,可通过碱基加到引物后端时所释放出的焦磷酸盐来提供检测信号。

针对每种碱基的特定波长的激光激发结合上的核苷的标记,这个标记会释放出荧光。荧光信号被 CCD 采集,CCD 快速扫描整个阵列检测特定的结合到每个片段上的碱基。通过上述的结合,检测可以重复几十个循环,这样就有可能决定核苷酸片段中的几十个碱基。Illumina 测序仪具有所需样品量少、高通量、高精确性、拥有简单易操作的自动化平台和功能强大等特点,此反应可以同时检测上亿个核苷酸片段,因此在同一个芯片或几个芯片上花费很少(只需常规方法的 1%)的成本就可测试全基因组。

Illumina 测序的一般流程为以下 4 个步骤,如图 17-16 所示。

(1) 文库制备:将基因组 DNA 打成几百个碱基(或更短)的小片段,在片段的两个末端加上接头(adapter)。

(2) 桥式 PCR(bridge PCR)产生 DNA 簇:Illumina 测序的芯片表面连接有一层单链引物,两端已连接测序接头的单链 DNA 片段与芯片表面的引物互补,扩增后变成双链,然后通过变性后再成为单链,该单链 DNA 的一端就被“固定”在芯片上。另外一端(5'或 3')可以随机和附近的另外一个引物互补,也被“固定”住,形成“桥(bridge)”。经过反复 30 轮扩增后,每个单分子得到了 1000 倍扩增,成为单克隆 DNA 簇。DNA 簇产生之后,扩增子被线性化,测序引物随后杂交在目标区域一侧的通用序列上。

(3) 测序:Illumina 测序系统应用了边合成边测序(sequencing by synthesis)的原理。加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP。这些核苷酸是“可逆终止子”,因为 3'羟基末端带有可化学切割的部分,它只容许每个循环掺入单个碱基。用激光扫描反应板表面,读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类。将这些基团化学切割,恢复 3'端黏性,继续聚合第二个核苷酸。如此继续下去,直到每条模板序列都完全被聚合为双链。这样,统计每轮收集到的荧光信号结果,就可以得知每个模板 DNA 片段的序列。

(4) 数据分析:自动读取碱基,数据被转移到自动分析通道进行二次分析。

3. ABI SOLiD 测序技术　SOLiD 测序原理是使用连接法测序获得基于“双碱基编码原理”的 SOLiD 颜色编码序列,随后的数据分析比较原始颜色序列与转换成颜色编码的 reference 序列,最后把 SOLiD 颜色序列定位到 reference 上,同时校正测序错误。SOLiD 连接

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

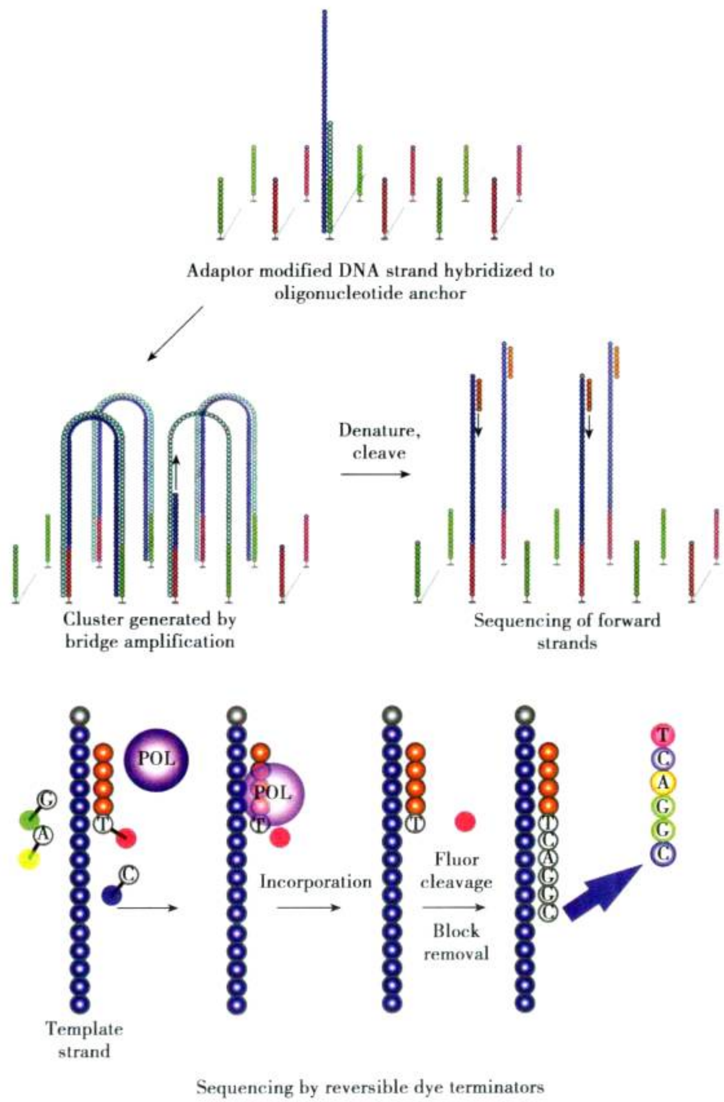


图 17-16　Illumina 测序流程

注:该图片来自:Voelkerding K V,Dames S A,Durtschi J D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clinical chemistry,2009,55(4):644. 图 2

反应的底物是 8 碱基单链荧光探针混合物。

连接反应中,这些探针按照碱基互补规则与单链 DNA 模板链配对。探针 5'末端可分别标记"CY5、Texas Red、CY3、6-FAMTM"4 种颜色的荧光染料,并且这四种颜色用数字"3、2、1、0"示意;探针 3'端 1~5 位为随机碱基,可以是"A、T、C、G"四种碱基中的任何一种碱基,其中第 1、2 位构成的碱基对是表征探针染料类型的编码区,"双碱基编码矩阵"规定了该编码区 16 种碱基对和 4 种探针颜色的对应关系,3~5 位的"n"表示随机碱基,6~8 位的"z"指的是可以和任何碱基配对的特殊碱基。单向 SOLiD 测序包括 5 轮测序反应,每轮测序反应

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

含有多次连接反应。

第一轮测序的第一次连接反应由连接引物“n”介导，由于每个磁珠只含有均质单链DNA模板，所以这次连接反应掺入一种8碱基荧光探针，SOLiD测序仪记录下探针第1、2位编码区颜色信息，随后的化学处理断裂探针3'端第5、6位碱基间的化学键，并除去6～8位碱基及5'末端荧光基团，暴露探针第5位碱基5'磷酸，为下一次连接反应作准备。因为第一次连接反应使合成链多了5个碱基，所以第二次连接反应得到模板上第6、7位碱基序列的颜色信息，而第三次连接反应得到的是第11、12位碱基序列的颜色信息。

“双碱基编码原理”实质上是阐明了荧光探针的颜色类型与探针编码区碱基对的对应关系。以四色荧光标记寡核苷酸的连续连接反应为基础，而没有采用传统的边合成边测序技术。因为连接反应没有DNA聚合酶合成过程中常有的错配问题，并且SOLiD特有的“双色球编码技术”又提供了一个纠错机制，这样设计上的优势使得SOLiD在系统准确性上大大领先于其他平台，其准确度可以达到99.94%以上。

SOLiD测序的一般流程为以下5个步骤，如图17-17所示。

（1）文库制备：SOLiD系统能支持两种测序模板：片段文库（fragment library）或配对末端文库（mate-paired library）。片段文库就是将基因组DNA打断，两头加上接头，制成文库。如果你想要做转录组测序、RNA定量、miRNA探索、重测序、3'，5'-RACE、甲基化分析、ChIP测序等，就可以用它。如果你的应用是全基因组测序、SNP分析、结构重排/拷贝数，则需要用配对末端文库。配对末端文库是将基因组DNA打断后，与中间接头连接，再环化，然后用EcoP15酶切，使中间接头两端各有27bp的碱基，再加上两端的接头，形成文库。

（2）乳液PCR/微珠富集：在微反应器中加入测序模板、PCR反应元件、微珠和引物，进行乳液PCR（emulsion PCR）。PCR完成之后，变性模板，富集带有延伸模板的微珠，去除多余的微珠。微珠上的模板经过3'修饰，可以与玻片共价结合。此步骤与454的GS FLX基本相同。不过，SOLiD系统的微珠要小得多，只有1μm。

（3）微珠沉积：3'修饰的微珠沉积在一块玻片上。在微珠上样的过程中，沉积小室将每张玻片分成1个、4个或8个测序区域。SOLiD系统最大的优点就是每张玻片能容纳更高密度的微珠，在同一系统中轻松实现更高的通量。

（4）连接测序：这一步的独特之处在于没有采用惯常的聚合酶，而用了连接酶。SOLiD连接反应的底物是8碱基单链荧光探针混合物。连接反应中，这些探针按照碱基互补规则与单链DNA模板链配对。探针的5'末端分别标记了CY5、Texas Red、CY3、6-FAM这4种颜色的荧光染料。探针3'端1～5位为随机碱基，可以是A、T、C、G四种碱基中的任何一种碱基，其中第1、2位构成的碱基对是表征探针染料类型的编码区，双碱基编码原理规定了该编码区16种碱基对和4种探针颜色的对应关系，而3～5位的“n”表示随机碱基，6～8位的“z”指的是可以和任何碱基配对的特殊碱基。

（5）数据分析：SOLiD测序完成后，获得了由颜色编码组成的SOLiD原始序列。理论上来说，按照“双碱基编码原理”，只要知道所测DNA序列中任何一个位置的碱基类型，就可以将SOLiD原始颜色序列“解码”成碱基序列。但由于双碱基编码规则中双碱基与颜色信息的简并特性（一种颜色对应4种碱基对），前面碱基的颜色编码直接影响紧跟其后碱基的解码，所以一个错误颜色编码就会引起“连锁解码错误”，改变错误颜色编码之后的所有碱基。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

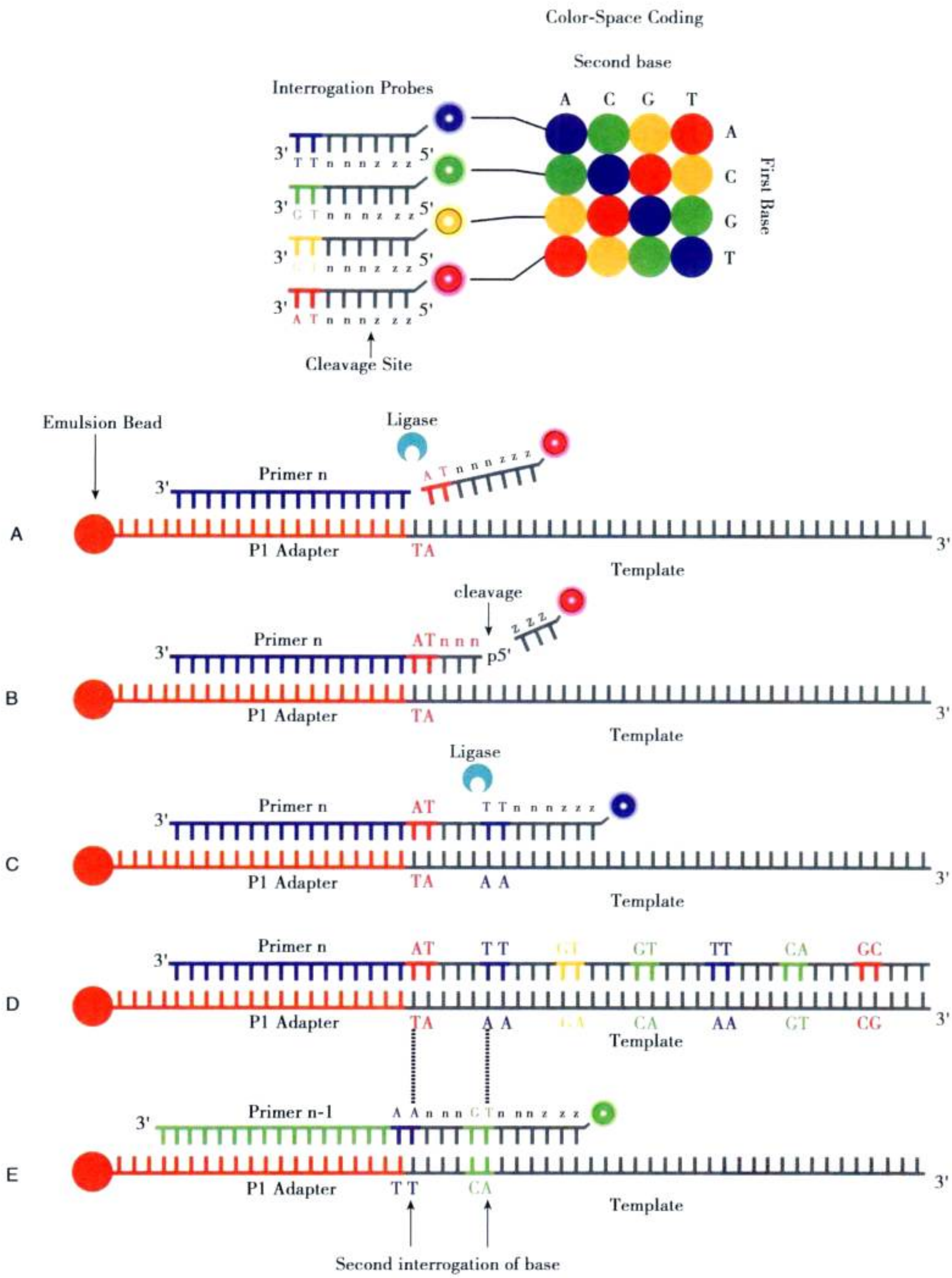


图 17-17 SOLiD 测序流程

注：图片来自：Voelkerding K V，Dames S A，Durtschi J D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clinical chemistry，2009，55(4)：646. 图 3

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（三）第三代测序技术

随着生物医学的迅速发展，对测序技术的速度、读长、准确性和测序成本等提出了更高的要求。第二代测序技术由于在制备测序文库的时候都需要经过 PCR 扩增，而 PCR 过程可能引入突变或者改变样品中核酸分子的比例关系。另外，第二代测序的读长普遍偏短，在进行数据拼接时会遇到麻烦。

为了克服这样的缺点，科学家们发展出了以单分子实时测序和纳米孔为标志的第三代测序技术。第三代测序技术被称为下下一代的测序（next-next-generation sequencing），第三代测序技术是基于纳米孔（nanopore）的单分子读取技术的直接测序方法，有着更快的数据读取速度，应用潜能也势必超越第一、二代测序。其技术流程不同于第二代测序依赖于 DNA 模板 PCR 扩增，使 DNA 模板与固体表面相结合，然后边合成边测序的方法，第三代测序为单分子测序，不需要进行 PCR 扩增。第三代测序方法与现在的测序技术相比有更多的优点：更高的通量、更快的测序速度、更长的读长、更高的准确性、对变异检测更高的敏感性、对样本起始量的需要更少以及更低的测序成本。

第三代测序技术尚在不断完善中，尚无成熟的商业化测序平台面世，未来主要平台代表有 Helicos 公司单分子测序仪、Pacific Bioscience 公司的 SMRT 技术平台以及 Oxford Nanopore Technologies 公司的纳米孔单分子测序平台。每个测序平台的测序原理简介如下：

1. Helicos 公司单分子测序仪 Helicos 公司的 Heliscope 单分子测序仪基于边合成边测序的思想，将待测序列随机打断成小片段并在 3′末端加上 Poly（A），用末端转移酶在接头末端加上 Cy3 荧光标记。用小片段与表面带有寡聚 Poly（T）的平板杂交。然后，加入 DNA 聚合酶和 Cy5 荧光标记的 dNTP 进行 DNA 合成反应，每一轮反应加一种 dNTP。将未参与合成的 dNTP 和 DNA 聚合酶洗脱，检测上一步记录的杂交位置上是否有荧光信号，如果有则说明该位置上结合了所加入的这种 dNTP。用化学试剂去掉荧光标记，以便进行下一轮反应。经过不断地重复合成、洗脱、成像、淬灭过程完成测序。Heliscope 的读取长度约为 30～35nt，每个循环的数据产出量为 21～28Gb。

2. Pacific Bioscience 公司的 SMRT 技术平台 Pacific Biosciences 公司的 SMRT 技术基于边合成边测序的思想，以 SMRT 芯片为测序载体进行测序反应。SMRT 芯片是一种带有很多 ZMW（zero-mode waveguides）孔的厚度为 100nm 的金属片。将 DNA 聚合酶、待测序列和不同荧光标记的 dNTP 放入 ZMW 孔的底部，进行合成反应。

与其他技术不同的是，荧光标记的位置是磷酸基团而不是碱基。当一个 dNTP 被添加到合成链上的同时，它会进入 ZMW 孔的荧光信号检测区并在激光束的激发下发出荧光，根据荧光的种类就可以判定 dNTP 的种类。由于 dNTP 在荧光信号检测区停留的时间（毫秒级）与它进入和离开的时间（微秒级）相比会很长，所以信号强度会很大。其他未参与合成的 dNTP 由于没进入荧光信号检测区而不会发出荧光。在下一个 dNTP 被添加到合成链之前，这个 dNTP 的磷酸基团会被氟聚合物（fluoropolymer）切割并释放，荧光分子离开荧光信号检测区。

3. Oxford Nanopore Technologies 公司纳米孔单分子测序平台 Oxford Nanopore Technologies 公司正在研究的纳米孔单分子技术是一种基于电信号测序的技术。他们设计了一种以 α-溶血素为材料制作的纳米孔，在孔内共价结合有分子接头环糊精。用核酸外切酶切割 ssDNA 时，被切下来的单个碱基会落入纳米孔，并和纳米孔内的环糊精相互作用，短暂地影

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

响流过纳米孔的电流强度，这种电流强度的变化幅度就成为每种碱基的特征。

三代测序技术的原理各有特点，适用范围也不尽相同，在实际应用中，没有哪一代测序技术具有绝对的优势，多种测序平台的结合可以得到更好的效果。随着计算机和生物医学的发展，新的测序技术将为基因生物医学研究开拓更广阔的应用天地。

四、下一代测序技术检测口腔微生物多样性分析

人类口腔是一个结构复杂、微生物活动频繁的环境，仅被唾液接触的表面积就达约 $215cm^2$。相比人体其他微生物定植表面，如皮肤、肠道、鼻腔及阴道仅有脱落表面，口腔既含有脱落表面黏膜，也有非脱落的固体表面。由于口腔环境的特殊性（温度、湿度、丰富的营养、复杂的结构以及理化性质的不同），为口腔内各种微生物的生长、繁殖和定居提供了非常适宜的环境，因而，也就造成了口腔微生物的多样性。口腔微生物群落定植于这些表面，与周围的环境一起共同构建了舌、软硬腭、黏膜牙面等多种不同的生境（niche），生境内微生物-宿主之间的相互作用与相应部位组织器官的健康或疾病状态密切相关。作为各生境的主要组成成分，目前已发现超过 700 种微生物。

龋病和牙周病是口腔常见的两大感染性疾病，它们均为多微生物参与的疾病，微生物以群体方式致病。这种致病方式意味着，群体中的每个个体均参与了疾病的发生、发展过程，即使是低丰度的成员依然可能作为复杂的群落行为表现的关键物种。对不同疾病状态下口腔微生物多样性的全面认识，是揭示疾病发病机制的基本条件。了解口腔微生物的多样性、口腔微生物的菌群变化，菌群的变化与疾病的关系以及影响口腔微生物菌群变化的因素，对于防治各种口腔疾病、促进人类的健康有着重要的意义。本节重点介绍下一代测序技术的研究方法对口腔微生物组成多样性和研究进展。

（一）健康口腔微生物多样性分析

1. 唾液微生物　唾液细菌的检出量平均约为 $10^7 \sim 10^{10}$ CFU/ml 唾液，主要分属 7 大类：厚壁菌门（Firmicutes）、变形菌门（Proteobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、放线菌门（Actinobacteria）、TM7、梭杆菌门（Fusobacteria）和螺旋体（Spirochaetes）；其中，厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门及放线菌门含量最高；TM7、梭杆菌门其次；螺旋体含量最低。

由于唾液的流动性，能到达口腔的大多数生境，并可常常检出口腔各生境的定植微生物，因此唾液被视为个体口腔各生境微生物的贮存器和运输器，而唾液菌群也被作为口腔感染性疾病（如龋病、牙周病）致病菌变化的检测指标。不同健康个体之间唾液微生物多样性存在着差异；同一个体的唾液微生物多样性在一定时间内具有稳定性，但是唾液微生物多样性没有明显的地理分布特征。

健康口腔唾液的优势微生物包括唾液链球菌、缓症链球菌、奈瑟菌、嗜血菌、小韦荣菌、乳杆菌、放线菌、二氧化碳噬纤维菌等。白假丝酵母菌是唾液中常见的真菌。唾液微生物组中特异性致病菌的出现或者微生物分布的变动可能在疾病症状出现的早期诊断中发挥重要作用，龋病、牙周炎、口腔鳞状细胞癌、胰腺癌患者的唾液中均有与健康人群分布不同的细菌存在。

2. 菌斑微生物　龈上菌斑是位于牙龈缘以上的牙面菌斑，是导致龋病发生的始动因素。健康人群龈上菌斑中细菌的种类丰富，Keijser 从 98 个健康成年受试者的龈上集合菌斑中发现了大约 6888 种细菌表型，厚壁菌门（*Firmicutes*）、放线菌门（Actinobacteria）为龈上菌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

斑的优势菌。

不同健康状态的牙体组织表面的龈上菌斑其组成存在差异。以龋病发生过程的不同阶段为例，健康釉质表面、白垩斑表面甚至龋损表面的菌斑菌群组成明显不同，不仅群落组成的多样性逐渐降低，且优势菌也存在差异。对根面菌斑的研究也有类似的结果。由于釉质与根面牙骨质或牙本质组成成分的理化性质不同，我们可以推测在同一牙齿釉质及牙骨质表面形成的菌斑组成可能是存在差异，这一推测需要实验研究来证实，同样需要验证的，还包括不同年龄人群的龈上菌斑组成之间的差异。

龈下菌斑是位于龈缘以下，分布在龈沟或牙周袋内。龈下菌斑与牙周组织的炎症性破坏密切相关，关于该生境微生物研究多集中于牙周疾病发生时组成的改变。龈下菌斑的细菌多样性较高，已经检测到超过 400 种细菌，它们主要隶属于 11 个门，包括放线菌门（Actinobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、绿弯菌门（Chloroflexi）、厚壁菌门（Firmicutes）、梭杆菌门（Fusobacteria）、变形菌门（Proteobacteria）、螺旋体属（Spirochaetes）、互养菌门（Synergistetes）、柔膜菌门（Tenericutes）未命名分类 TM7 和 SR11。其中厚壁菌门（Firmicutes）细菌是最常检测到的。健康龈下菌斑中链球菌属（*Streptococcus*）和韦荣球菌属（*Veillonella*）是检出率最高的，其他的一些菌属如乏养菌属（*Abiotrophia*）、弯曲菌属（*Campylobacter*）、二氧化碳嗜纤维菌属（*Capnocytophaga*）、孪生球菌属（*Gemella*）和奈瑟球菌属（*Neisseria*）也可以检出。

3. 口腔黏膜微生物　与口腔内其他生境相比，定植于的黏膜微生物多样性相对较低。黏膜细菌主要隶属于 4 个菌门，包括厚壁菌门（Firmicutes）、变形菌门（Proteobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）以及放线菌门（Actinobacteria）。舌部由于定植了大量与口臭相关的菌群而受到研究者的关注。健康人群的舌背定植了较多的唾液链球菌（*Streptococcus salivarius*）、黏液罗斯菌（*Rothia mucilaginosa*）和一种未确认种类的可培养的真杆菌（*Eubacterium*）。

4. 口腔微生物演替　分娩是胎儿脱离无菌的母体环境，进入有菌环境的分界线。新生儿口腔上皮表面在分娩后即刻即有不同的细菌定植。常规的分娩方式包括顺产及剖宫产两种。新生儿的口腔微生物组的组成随着生产方式的不同而存在着差异。Maria G. Dominguez 在新生儿分娩 5 分钟之内收集其口腔标本并对其中的微生物构成使用焦磷酸测序进行分析，结果发现顺产胎儿的口腔微生物组的组成与母体产道中的微生物相似，而剖宫产胎儿的口腔微生物组成则与母体的皮肤微生物组成相似。

初生婴儿的口腔、肠道、皮肤微生物组之间并没有差异存在，因而不同部位的微生物的分化时间及过程值得深入研究。不同的分娩方式不仅在短时间内影响口腔微生物的组成，即使在胎儿出生后 3 个月，这种影响依然存在。与顺产婴儿相比，剖宫产婴儿口腔中的微生物种类明显少于顺产婴儿，*Slackia exigua* 这种可从感染根管、牙周袋、口外伤口及肠道脓肿中分离的致病菌也仅在剖宫产胎儿口腔中检测出。许多研究者认为，剖宫产减少了生产过程中新生儿与细菌的接触时间，使微生物组成相对简单，降低了致病菌入侵机体的生物防御屏障的抵抗能力。出生后 2 个月以内，婴儿口腔中的厌氧菌比例并不高，随着年龄的增加比例逐渐增加。在婴儿出生后的数月之内，口腔微生物的演替过程最主要的影响因素是人与人之间的水平传播、唾液组成成分、喂养方式及微生物之间的相互作用。

根据牙齿的萌出状况，一般来说，可以将人分为无牙列期、乳牙列期、混合牙列期及恒牙列期以及老年人的无牙列期。在牙齿萌出以前，婴儿口腔中便已定植了丰富的细菌，与其母

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

亲或者主要的照顾者相比，婴儿口腔中的微生物多样性较后者低，但是变异链球菌属的比例在婴儿中的比例比在成人唾液中的比例高。在乳牙列至恒牙列的各个发育阶段，厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门及放线菌门细菌均为优势菌。部分细菌如螺旋体、韦荣菌随着年龄的增加而比例不断增加，而颗粒链球菌则表现出了相反的趋势，反映了口腔微生物组不断成熟的过程。

到目前为止，尚无直接比较儿童、青少年、成年人及老年人口腔微生物组之间差异的研究，从不同的研究中可以发现，虽然口腔微生物组随着年龄的增加不断地成熟，但是到青春期时，青少年的微生物组与成人相比还是存在着差异，其微生物组的多样性还是低于成年人微生物组。

（二）口腔感染性疾病微生物多样性分析

1. 龋病　龋病（dental caries）是口腔最常见的两大感染性疾病之一，人在一生中各个阶段均对其有易感性。随着龋病的不断进展，不仅会导致牙体组织的破坏，还会导致牙髓、根尖周及牙周感染。对龋病微生物多样性进行分析，标本多取自龈上菌斑、唾液及感染的牙本质。目前研究的热点集中于乳牙列的早期儿童龋、成人龋活跃性患者及老年人根面龋。

严重早期儿童龋（severe early childhood caries，S-ECC）是猛性龋中的一种特殊类型，可引起乳牙牙体组织崩解，进一步导致乳牙牙髓病及根尖周疾病的发生，继而影响恒牙胚的正常发育。牙菌斑生物膜中链球菌属（如副血链球菌）、韦荣菌属、放线菌属、颗粒菌属（如苛求颗粒链球菌）、纤毛菌属、硫单胞菌属、双歧杆菌、普雷沃菌等多种细菌在 S-ECC 儿童的菌斑中检出率均较无龋儿童高，被认为是与 S-ECC 的相关细菌。对进行系统性治疗的 S-ECC 患者进行随访观察，再次出现龋损的患者较治疗后无复发的儿童，其治疗前菌斑中的变黑普雷沃菌及二氧化碳嗜纤维菌比例高；如果 S-ECC 得到了较好的控制，牙菌斑生物膜中变异链球菌的比例会出现降低。

在成人龋活跃患者菌斑中链球菌、乳杆菌、放线菌、丙酸杆菌、韦荣菌等细菌检出率较高，格氏链球菌、颊纤毛菌也经常在这些患者的菌斑中大量出现。虽然成人唾液中的微生物多样性在个体之间存在差异，但是在龋活跃性患者的唾液中这种变异更为显著。除此之外，普雷沃菌属的多种细菌在成人龋活跃及无龋患者唾液中的比重不同。更为有意义的是，采用宏基因组学的方法，在龋活跃的患者菌斑中，可检测到产酸相关性基因、DNA 摄入及应激态相关基因的大量表达。

根面龋多发生于牙龈退缩的老年患者。由于牙根组织表面是牙骨质，其组成和结构与釉质存在明显的不同，因此与釉质龋的微生物多样性也有明显的不同。奇异菌属（*Atopobium*）、*Olsenella*、*Pseudoramibater*、丙酸杆菌属及月形单胞菌属均参与了根面龋的发生发展。从根面龋患者的健康牙根面、白垩斑表面、龋损表面甚至感染的牙本质内可检测到大量的乳杆菌，这与健康人群牙根表面菌斑中没有乳杆菌检出形成鲜明对比。

从临床角度讲，龋病可表现为牙体组织完整的白垩斑及牙体组织破坏形成的龋洞。在龋病发展的这一进程中，与疾病发展相关的微生物也存在着动态变化。龋活跃者细菌的多样性从健康牙表面的菌斑、白垩斑、龋损表面菌斑到深部感染的牙本质逐渐降低。在龋病发生的不同阶段，优势菌同样会发生改变，从以非变异链球菌的链球菌及放线菌为主，逐渐过渡为以变异链球菌、乳杆菌及双歧杆菌为主。有趣的是，乳牙及恒牙不同龋病发展阶段的优

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

势菌并不完全一致。

乳牙及恒牙的白垩斑中，唾液链球菌及副血链球菌为优势菌；乳牙龋损表面检测到的主要是唾液链球菌、副血链球菌、棒状杆菌、杰锐斯放线菌（*Actinomyces gerencseria*），而恒牙龋损表面检测到的优势菌为唾液链球菌、副血链球菌、弯曲菌及月形单胞菌；深部感染牙本质含有大量的变异链球菌、乳酸杆菌、丙酸杆菌等产酸菌。

2. 根尖周感染　根尖周炎是发生于牙齿根尖周组织的感染性疾病，根管系统内定植的微生物是其主要的致病因素。尽管拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、梭杆菌门和变形菌门细菌是感染根管内最常检出的五大优势菌群，但该疾病的发生并非是某一种或者某几种细菌所引起，而是根管内细菌以群体的方式和宿主相互作用的结果。传统培养方法已经证实根管感染是一种多细菌感染，同时原发性感染和再感染根管中微生物多样性存在差异，分子生物技术方法也证实了上述观点。分子生物学检测手段的大量运用，不仅使得与根管感染相关微生物的了解增加，在一定程度上甚至引起了根管感染病因学认识的转变。

感染根管内的微生物谱具有个体差异性，即不同个体感染根管内的微生物群落并不完全一致，同时也具有部位差异性。即便是同一个体的某一特定感染根管内，近根尖端与近冠方的微生物组成也不同：前者较后者微生物多样性更高；优势菌群也不同，根尖区以专性厌氧菌为主，并且随时间延长细菌数量增加。

部分革兰阴性菌被认为与根尖周炎特定的临床表现之间可能存在关联，而这些细菌在没有临床症状的感染根管中也有相似的检出率，有学者提出微生物群落结构的改变与临床症状相关性更高。以有或无急性感染症状的慢性根尖周炎为例，两者微生物组中菌群组成不同，前者微生物多样性较后者更高。这种多样性的改变，一方面可能导致群落中出现高毒力菌株，另一方面可能改变群落内部微生物相互作用的模式或者使得其复杂性增加，从而提高群体的毒力，导致相应临床症状的出现。

3. 牙周病　牙龈炎是指发生于牙龈的炎症性疾病，与牙面菌斑的堆积及菌斑内细菌和牙龈组织之间的相互作用密切相关。随着牙龈炎的发展，龈下菌斑的优势菌群由链球菌逐渐变成放线菌、二氧化碳噬纤维菌、弯曲菌、艾肯菌、梭杆菌、普雷沃菌等。牙龈炎患者口腔内不同牙位的龈上、龈下菌斑的微生物多样性相类似，但与健康人群之间菌斑存在差异，这两类人群的唾液微生物组并不会因为罹患牙龈炎而发生明显差异。

牙周炎患者龈下菌斑中微生物的组成变化极其复杂，借助于分子生物学手段，在牙周炎发生部位已检出了超过 400 种细菌。Griffen 等发现了牙周炎患者龈下菌斑中有 123 种细菌在群落中的比重上升而 53 种细菌的比重下调。除牙龈卟啉单胞菌（*P. gingivalis*）、齿垢密螺旋体（*T. denticola*）和福赛斯坦纳菌（*T. forsythia*）外，其他多种细菌被认为与牙周炎的发生密切相关，如拟杆菌（*Bacteroidetes*）、隐藏真杆菌（*Eubacterium saphenum*）、牙髓卟啉单胞菌（*P. endodontalis*）、栖牙普雷沃菌（*P. denticola*）、微小消化链球菌（*P. micros*）、消化链球菌（*Peptostreptococcus*）、龈沟产线菌（*Filifactor alocis*）、脱硫球茎菌（*Desulfobulbus species*），小杆菌（*Dialister*）、互养菌（Synergistetes）、龈沟螺杆菌（*F. alocis*）等。

链球菌属、韦荣菌属、贫养菌属（*Abiotrophia* genera）、弯曲菌属（*Campylobacter*）、二氧化碳噬纤维菌属（*Capnocytophaga*）、孪生球菌（*Gemella*）及奈瑟菌（*Neisseria*）被认为是牙周有益菌。吸烟作为牙周炎重要的危险因素，不仅可使牙周炎患者龈下菌斑内细菌的相对比例发生改变，增加牙周致病菌的比例，同时还可引起这些微生物之间共存关系的改变，如不吸烟

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的患者，其龈下菌斑中大量的链球菌可减少微单胞菌属这种致病菌的比重。然而，吸烟患者的龈下菌斑中，在检出大量链球菌的同时，微单胞菌属的检出水平依然很高；戒烟可引起患者龈下菌斑中的牙周致病菌比例下降，有益菌如小韦荣菌（*Veillonella parvula*）比例升高。

对侵袭性牙周炎相关微生物的研究认为，月形单胞菌属细菌（*Selenomonas sp.*）为龈下菌斑的优势菌群，一直被认为与该疾病发生密切相关的伴放线菌聚集杆菌（*A. actinomycetemcomitans*）并没有检出。难治性牙周炎患者的龈下菌斑中含有更多的微小消化链球菌（*Peptostreptococcus micros*）、纤细弯曲菌（*Campylobacter gracilis*）、缠结优杆菌（*Eubacterium nodatum*）、有害新月形单胞菌（*Selenomonas noxia*）、福赛斯坦纳菌（*Tannerella forsythia*）、牙龈卟啉单胞菌、普雷沃菌属细菌（*Prevotella spp.*）、螺旋体属细菌（*Treponema spp.*）、啮蚀艾肯菌（*Eikenella corrodens*）。

大量基于分子生物学的研究共同表明，牙周炎部位的优势菌为非革兰阴性菌，这与之前基于培养技术的研究结果截然相反。导致这两种不同研究结果的原因在于，定植于龈下菌斑的革兰阳性厌氧菌其染色性具有可变性，同时纯培养的时间过长可导致其革兰染色呈现阴性。

（三）口腔微生物多样性与全身健康

1. 口臭　口臭（oral malodor or halitosis）是指呼吸时口腔发出的不良气味，分为口源性口臭及非口源性口臭。口腔细菌腐败分解含硫氨基酸多肽和蛋白质产生的挥发性硫化物和具有异味的脂肪酸被认为是口源性口臭的直接原因。

自从 Gordon 首次研究舌背细菌与口源性口臭关系后，人们逐渐意识到舌背（尤其是舌背后部）的细菌是牙列完整和牙周健康的人群产生口源性口臭的重要因素。口源性口臭患者的舌背细菌多样性与健康对照组之间存在差异。口源性口臭患者舌背上发现的优势菌包括 *Solobacterium moorei*、短小奇异菌（*Atopobium parvulum*）、龈沟优杆菌（*Eubacterium sulci*）。唾液链球菌（*Streptococcus salivarius*）、黏液罗斯菌（*Rothia mucilaginosa*）以及一种未确认种类的可培养的真杆菌（*Eubacterium*）在健康对照组中数量最多，更有研究结果显示 *Solobacterium moorei* 仅在口臭患者标本中检出，该细菌一度被称作口臭的“罪魁祸首”。尽管唾液链球菌在口臭患者及健康人群口腔中的分布情况至今仍然存在争议，例如 Kazor 认为唾液链球菌是健康对照人群舌背上最具优势的菌种，相反其在口源性口臭患者的舌背上数量较少甚至缺如；Riggio 则发现该菌同为口臭患者组和健康组的优势菌群；也有学者指出，唾液链球菌可以作为一种具有良好前景的口臭微生态制剂治疗口臭。

2. 心血管疾病　动脉粥样硬化多由脂肪代谢紊乱、神经血管功能失调引起大、中动脉内膜出现含胆固醇、类脂肪等的黄色物质，常导致血栓形成、供血障碍等。动脉粥样硬化斑块含有大量的链球菌及韦荣菌，几乎所有的动脉硬化粥样斑块中均可检出牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*），同时具核梭杆菌（*Fusobacterium nucleatum*）、福赛斯坦纳菌（*Tannerella forsythia*）的检出率也高于 50%；梭杆菌、链球菌、奈瑟菌的分布水平与该疾病的危险信号（如血浆胆固醇）的水平相关。

3. 肿瘤　肿瘤是机体局部组织的某个细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控，导致其克隆性异常增生而形成的新生物。微生物诱发的炎症参与了 15% ~20% 人体肿瘤的发生。对于口腔微生物组与肿瘤的相关性如肿瘤患者口腔微生物组的改变、从口腔微生物组中寻找进行肿瘤早期诊断的标记物是否具有可行性以及肿瘤的治疗对口腔微生物组的影响

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

等方面均是当前研究的热点。

鳞状细胞癌是口腔内最常见的恶性肿瘤。口底癌患者唾液微生物组的构成中,机会性致病菌的比例较健康人群明显增加,与此同时,不同的癌症患者之间唾液微生物组之间的相似度较之健康人群间的相似度更高。口腔微生物组的这种改变并非仅局限于口腔局部肿瘤患者中,口腔微生物组也可能参与了远隔器官肿瘤的发生或被远隔器官发生的肿瘤所影响。以胰腺癌为例,患者唾液微生物组中缓症链球菌及长奈瑟菌在胰腺癌患者唾液中的比例较健康人群明显低,这两种细菌是否可称为胰腺癌患者早期诊断的标记物尚待考虑。

手术、放疗及化疗是肿瘤治疗的三大主要手段。放化疗对口腔微生物组的影响也被高通量测序的诸多手段进一步证实。研究显示,化疗后口腔微生物多样性增高,Napeñas 对 9 例患乳腺癌患者化疗前后的口腔微生物组分析发现,放疗后检测到了 41 种新菌种,其中的 36 种是在化疗前从来未发现的。化疗患者口腔微生物的优势菌群包括孪生球菌属和链球菌属细菌,最主要的是溶血孪生球菌(*G. haemolysans*)和缓症链球菌,只有化疗后才可检出的细菌包括 *Lachnospiraccae* 科细菌、氨基酸球菌属细菌(*Acidaminococcus*)、梭菌目细菌(*Clostridiales*)、*Oribacterium*、*Johnsonella*、消化链球菌属细菌(*Peptostreptococcus*)、*Aggregatibacter*、嗜血杆菌属细菌(*Haemophilus*)以及拟杆菌门细菌(*Bacteroidetes*)。放疗后也会导致口腔微生物多样性发生显著改变。

4. 其他疾病　分子生物学发展和广泛应用不断地扩展了人们对口腔微生物与系统性疾病之间关系的认识。Docktor 使用人类口腔微生物组芯片发现克罗恩病的儿童患者舌部微生物的多样性较健康儿童低,梭杆菌门(*Fusobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)的改变最为明显;Han YW 在流产妇女子宫内发现来自口腔的具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*);Goodson 甚至提出口腔微生物可能参与了肥胖的发生过程。

五、口腔微生物宏基因组学研究展望

宏基因组学自 1998 年提出以来,已过去了 10 多年,已经成为当前发展最快的学科之一。到目前为止,宏基因组学技术已应用于微生物学研究的诸多领域,已有超过 210 种不同的环境微生物群落(包括土壤、海洋、人类肠道、皮肤、口腔等)宏基因组被深度测序,从这些环境宏基因组中获得了大量功能基因,它们在微生物资源多样性开发、新型生物活性物质筛选、抗生素抗性发掘和新药研发、维生素合成、污染物降解以及微生物致病基因筛查等方面都具有广阔的前景,是基因工程研究的热点。

随着 2007 年美国"人类微生物组计划"(human microbiome project,HMP)以及 2008 年欧盟"人类肠道宏基因组计划"(MetaHIT)的开展,与人体密切相关的微生物群落受到更多的关注。人类肠道、口腔等部位中的细菌整体拥有的基因组远远多于人类自身,它们的基因组可被视作人类的"第二基因组"。对它们宏基因组的研究不仅将对人类自身健康与体内微生物的微妙关系作出科学的诠释,也更有助于预防、监控和干预由肠道菌群引发的免疫低下、肥胖、肠炎和糖尿病等疾病。目前,医学领域宏基因组学相关研究还相对较少,大部分研究集中于对肠道宏基因组的功能研究,但是发展非常迅速。2010 年,MetaHIT 计划的研究小组在 *Nature* 以封面文章的方式,着重介绍了题为"人体肠道菌群宏基因组参考基因集的构建工作"的论文,为肠道微生物群落研究奠定了基础。

相对于肠道宏基因组研究,口腔宏基因组研究目前较少。Diaz-Torres 等利用宏基因组

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

学方法，对口腔细菌群体中耐药基因进行了分析，结果证明用宏基因组学方法进行耐药情况调查和研究是可行的。Pedro 等对健康口腔和患龋病或牙周病口腔的宏基因组测序分析后发现，口腔微生物群落功能与肠道微生物群落功能基因分布不同，在未患过龋病的受试者宏基因组中发现了高表达的功能基因簇，例如抗菌肽和密度感应等功能相关基因。李燕等首次使用功能基因芯片 GeoChip 用于对牙周病、龋病微生物群落的功能基因研究，目前已经取得了阶段成果，牙周病微生物组的功能基因多样性较正常对照更少，而龋病与之不同，它的功能基因和健康组比较总体上并没有显著不同。

相对传统技术而言，宏基因组学技术确实突破了很多研究障碍，但宏基因组学技术也存在局限性，如不同的取样和 DNA 提取方法会影响宏基因组研究的结果，这些工作的标准化尚需进一步的工作，尤其是人体样本由于受人自身 DNA 的影响，环境微生物基因提取效率偏低；另外，面对海量的宏基因组信息，如何选择最佳的生物信息学分析方法及模式微生物全基因组序列获得将直接影响宏基因组学研究结果的准确性。要得到不可培养的大多数微生物的信息，还有很漫长的路要走。随着更便宜、更快捷的测序方法出现，环境基因测序将会产生更加多样的数据和信息。测序并非我们认识环境微生物的唯一方法。我们还需要其他新技术，除了能获得未知环境微生物群落的遗传信息以外，还需要了解其中微生物复杂的生命活动过程，让我们解决更多悬而未决的环境微生物的问题。随着基于系统生物学的“组学”技术的高速发展，关注微生物群落基因表达和蛋白质产出的研究逐年增多，很大程度上补充了单纯基于 DNA 测序的宏基因组分析。微生物群落系统生物学研究示意图见图 17-18。

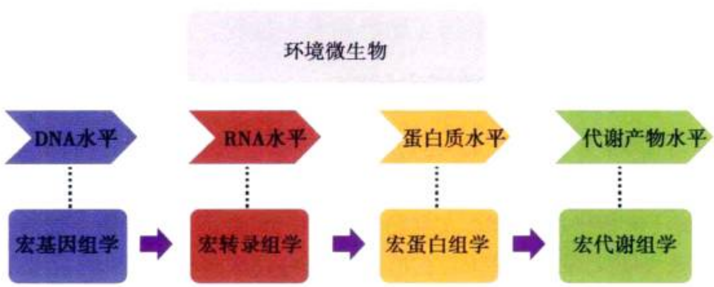


图 17-18　微生物群落系统生物学研究

宏转录组、宏蛋白组和宏代谢组技术使我们有可能了解微生物群落的功能动态变化，它们与宏基因组的信息结合以后，将为揭示微生物群落在这些环境中的组成、功能以及复杂的相互关系。除此之外，对这些产生的海量数据的挖掘为复杂的微生态系统功能、微生物生态结构和进化分析提供了路径，使对过去无法培养和未知的微生物的研究成为可能。通过这些分析可以了解在一个未知的微生物群落中有哪些微生物？它们各自在扮演什么角色？以及它们之间的相互关系如何？

随着宏基因组学和其他“组学”技术的发展，将会不断拓展口腔微生物群落的研究思路与方法，为口腔不同生境中的可培养和未培养微生物研究提供强有力的理论基础和技术支撑。相信，在不远的将来，更多新基因的挖掘、口腔微生物间相互作用新机制的提出、微生物代谢定向调控以及益生菌微生态防治口腔疾病等都将成为现实。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第三节　牙菌斑生物膜形成实验

虽然生物膜在自然环境中广泛存在，而体外实验室菌斑生物膜的形成则需要特定的研究模型来模拟生物膜形成的相关条件。牙菌斑的形成是一个复杂的过程，大致可以分为3个阶段：①获得性膜形成阶段：由口腔唾液糖蛋白附着在釉质表面形成膜样物质。为口腔细菌初期黏附提供了基质；②细菌附着阶段：当牙面获得性膜形成后，口腔细菌很快附着上去，并在获得性膜表面生长，并产酸，使唾液糖蛋白沉积；③菌斑成熟阶段：细菌在获得性膜上生长、发育、繁殖和衰亡，并在其中进行复杂的代谢活动。

口腔是一个开放性环境，已知可存在的菌种达700余种。在不同牙部位参与形成牙菌斑生物膜的细菌也不尽相同。口腔环境的复杂性和口腔疾病的体内研究所涉及的伦理问题，不可避免地促进了实验室模型的发展。牙科临床工作者可以说是生物膜研究的先锋，他们首先认识到龋齿的发病原因与生物膜相关。这种合理的思维正如数百年前的微生物学之父荷兰人 Antonie van Leeuwenhoek 所经历的相似。他将从牙齿上刮下来的牙菌斑在显微镜下观察，给后人留下了牙菌斑的形成与微生物相关的这些最原始的图像及描述。口腔生物膜的研究，可以说是到目前为止开展最好而且研究颇有深度的领域。类似的生物膜感染性疾病，比如龋齿，涉及饮食、唾液、牙菌斑微生物及牙齿表面是否易感等因素的相互作用，相当复杂。况且，影响动物口腔的因素与人差别极大，因此很少有特异性的动物模型专门开发给口腔生物膜感染研究使用。

口腔生物膜研究有一个得天独厚的优势，就是可以直接在患者和健康志愿者中进行。许多的试验研究技术都可以以人为本，直接用人做模型。比如，牙菌斑是在口腔生物膜疾病中被研究较多的，可以有目的地置入异物到人体口腔的局部，诱导生物膜的形成，试验的过程简单易行。在通常情况下，将各种不同类型的试验材料及不同表面结构的小芯片固定在志愿者的口腔，志愿者在规定时间内全程佩戴这些小芯片。研究结束后，从志愿者口腔中收集回他们佩戴过的芯片，用常规的方法培养处理下来的牙菌斑标本，并做细胞活性染色。如果让部分口腔佩戴芯片的志愿者同时使用一些抗菌剂，其研究结果还可以评价各种抗菌剂对牙菌斑形成的影响，给我们现行的预防及治疗方法提供参考启示。

在这些研究中，通常运用成像法来观察生物膜形成的情况。比如共聚焦激光扫描显微镜的使用，结合非破坏性的 Live/Dead 染色技术，评估消毒剂或抗菌剂对生物膜的即刻杀菌效果。人作为牙菌斑生物膜的研究模型与其他的体内外生物膜的模型相比，具有许多明显的优势。首先，口腔牙菌斑生物膜不是单由一种细菌引起的同质生物膜，与由试验设计选择的单一微生物引起的同质生物膜感染有极大的区别；其次，这些生物膜是由人体口腔实际的菌群在相关的生理条件下形成，简单易行，一般不存在重大风险的问题；再者，人牙菌斑生物膜这一模型具有多样性，可以用在口腔生物膜研究的许多领域，包括研究多重菌属异质生物膜的动态进展，评估抗生物膜附着和治疗的作用。

人工制备牙菌斑生物膜可在体外进行，也可以在体内进行。根据口腔不同部位细菌分布，可分为龈上菌斑、龈下菌斑等。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

一、龈上菌斑生物膜体外形成实验

龈上菌斑易于收集且其生存环境易于模拟。目前已有多种模型被用于研究龈上菌斑生物膜的形成。应用较多的有恒化器、恒定厚度生物膜发酵罐、人工口腔和Zurich模型等。

（一）静态生物膜培养系统

静态生物膜培养系统（static culture system）采用分批式培养（batch culture）的培养方法，常用来观测细菌在1~2天内的生物膜形成情况。图17-19是NUNC公司生产的静态生物膜培养系统装置。在左右小室的底部放置釉质片和羟磷灰石片等实验表面，在NUNC系统左侧加入培养基对照，右侧加入细菌悬浮液（A），经过一定时间的静置培养，细菌在系统的底部的表面形成厚厚的生物膜（B）。在这种系统下形成的生物膜结构需要用共聚焦激光扫描显微镜观测，并且目镜要使用水镜，以直接深入培养基液面。

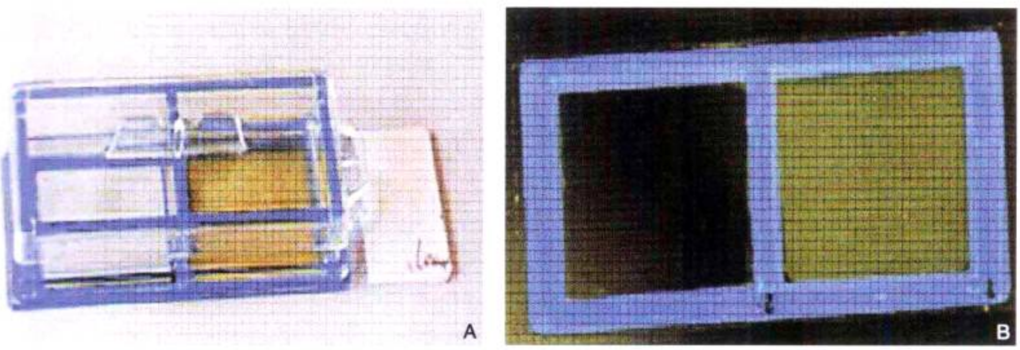


图17-19　静态生物膜培养系统

注：由NUNC公司生产的静态生物膜培养系统分为2个小室，可以同时培养2种细菌的生物膜。图中左侧小室加入培养基，右侧小室加入一定浓度的用同种培养基稀释的细菌悬浮液，经过一定条件下的静置培养，细菌在小室的底部表面形成生物膜

（二）发酵罐

发酵罐（constant depth film fermenter，CDFF）已广泛应用于生物膜的研究。CDFF可生成稳态的生物膜，且其模拟的菌斑生长环境更具代表性。CDFF包含了一个旋转台，内有多个等深度的小凹槽，釉质片或羟磷灰石片可置入凹槽内以提供菌斑形成的表面，当凹槽中生物膜达到一定厚度时，上方旋转的刀片就会除去多余的生物膜，以保证生物膜处于恒定厚度。CDFF内接种的细菌可来自厌氧培养恒化器内的混合菌液或来自于唾液/菌斑接种物。CDFF可通过一个过滤装置和空气直接相通，以保持有氧环境。尽管CDFF有很多优点，尤其在研究成熟生物膜的特性和抗菌物质活性方面，但其主要缺点是无法确定细胞生长率，且可重复性较差。

（三）恒化器

恒化器（chemostat）是一种集通气、搅拌和连续灌注培养于一体的高精度控制生物反应器。它以恒定的速度流出培养液，控制培养基中营养物，主要是生长限制因子的浓度。通过生成稳态匀质的培养物来调控微生物生长繁殖与代谢速度，使容器中的微生物保持在悬液状态，且生长繁殖始终低于最快生长速度（图17-20）。主要用来研究环境因素对混合培养口腔菌群的影响。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

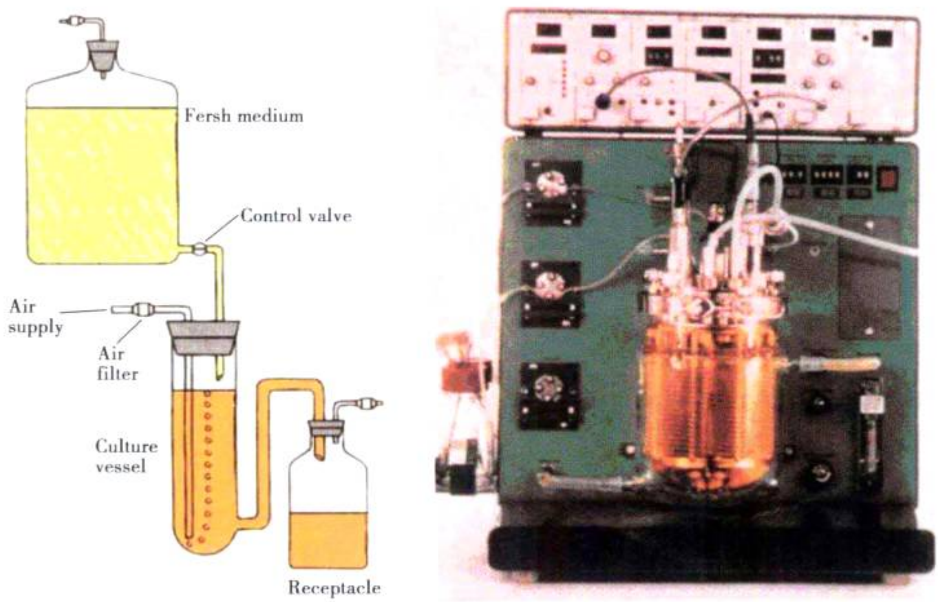


图 17-20　恒化器模式图

注:图片来自:http://image. baidu. com/i? ct=5033164802

（四）流式生物膜培养系统

流式生物膜培养系统(flow cell system)是将恒化器与一个恒流装置相连接,将恒化器中生成的稳态混合菌液连续或间断地滴加在恒流装置中的实验载体上。它采用了恒化器的培养方式,通过匀速转动的动力泵以固定的流速向生物膜提供液体营养,流入的液体培养基首先经过排气装置(bubble trap)后到达流动池(flow cell),细菌在流动池中的流动管道(flow channels)中生长,之后废液以相同的流速排出。排气装置的作用是收集系统内形成的气泡,防止气泡将流动管道中的生物膜冲散。流动池是一个上下密封的玻璃系统,只有两端有小孔供培养基的流入和流出。

流式生物膜培养系统由培养基容器、动力泵、排气装置、流动池和废液缸几个部分组成,中间由硅胶管连接。泵将液体培养基以一定的速率泵入生物膜培养系统,以供细菌在流动管道中的生长。

（五）人工口腔

1952 年,Pigman 提出了“人工口腔”一词,随后即被应用到菌斑生物膜培养系统中。人工口腔是一系列自行设计制作的模拟人类口腔环境的体外培养系统,基本装置包括恒温培养器、气体供应库、营养供应库、唾液供应库、蠕动泵和废物罐,且每个装置均可拆卸消毒。人工口腔是一种连续培养装置。它可以模拟天然口腔的各项参数,包括细菌牙体组织、温度、唾液、食物及咀嚼运动等。经过多年的发展和改进,人工口腔内添加了牙齿切片、pH 值和氧化还原电位(Eh)电极,着重强调了对 pH 和 Eh 的监测,对废物内微生物的分析,单一培养和多菌种的培养。甚至还形成了包括 6 个相同的培养室,每个培养室独立控制菌斑生长,这样可以同时研究和菌斑形成相关因素的系统。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

Wong 等结合之前的人工口腔系统设计了一种多菌斑单一培养室的培养系统。该系统采用计算机控制装置，所有培养单元位于一个单一的培养室，在相同的实验条件下生成多个样本，可用于多菌斑样本的长期生长；该系统还可用于测定菌斑钙水平，进行氟化物和磷酸盐的分析。

（六）Zurich 模型

Zurich 模型由 Guggenheim 等设计和首先应用于龋病相关牙菌斑生物膜的研究。该模型采用批量培养而非连续培养模式，可在 24 孔、96 孔等培养板中大量培养多个牙菌斑生物膜，形成一种高通量的牙菌斑生物膜研究模型。Guggenheim 等人将羟基磷灰石片放置于 24 孔斑底部，孔中加入龋病相关微生物，用 1∶1 或 7∶3 唾液/培养基在厌氧条件下进行培养，可在不同时间收集牙菌斑用于动态观察菌斑形成过程。

（七）高通量生物膜形成模型

O'Tool 等人利用 Zurich 模型原理，用 96 孔板培养细菌生物膜也获得成功。这种高通量菌斑生物膜形成模型可同时检测不同菌株形成生物膜的能力以及方便研究菌斑生物膜形成的动态过程（图 17-21）。这个方法简单快速而且重复性好，因此被广泛应用。其流程如下：在 96 孔等板底部加入羟基磷灰石片等附着介质，再加入适量（100～200μl）细菌悬浮液，然后在适宜的温度下培养，细菌附着在小孔底部介质或内壁上形成生物膜。各个小孔内的生物膜除了取出来分析之外，还可以用结晶紫染色的方法定量。结晶紫（crystal violet）是常用的细胞染色剂，用它定量生物膜的步骤大致如下：

将长有生物膜的 96 孔板中的液体倒掉，以除去悬浮状态生长的细菌，只留下附着于内壁生长的生物膜。用适量生理盐水洗 2 次，尽量去除悬浮细胞。加入适量结晶紫染料，染色 10 分钟左右。结晶紫染料为 0.01% 的结晶紫溶于适当浓度的乙醇。用可读取 96 孔板的分光光度计在波长 590nm 下读数。读数反映的是附着在内壁上生物膜的生物质（biomass）的量。这个方法适用于大规模筛选，但是不便于深入观察和分析生物膜的结构、功能等，因此研究中也常将其与其他方法相结合。

高通量生物膜培养方法是利用 96 孔板检测菌株形成生物膜的能力，然后用结晶紫染色

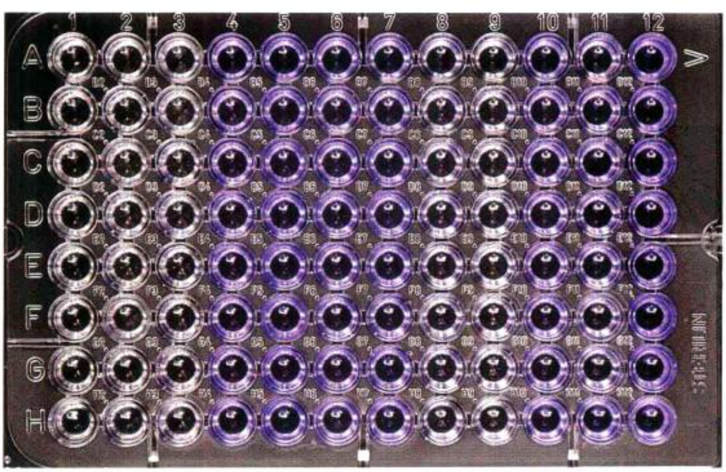


图 17-21　高通量生物膜培养系统

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

法定量。图中最左侧一行(1A～1H)为培养基对照,紫色较深的孔为生物膜形成能力较高的菌株,浅色或无色的孔为生物膜形成能力较差的菌株。

该生物膜模型除了设计简单外,最大的优点在于添加物可以在应用至系统的同时从系统中移除,因此,Zurich 模型可以很好地控制化学物质的暴露时间,尽可能地模拟漱口行为。Zurich 模型还可用于微生物的黏附与共聚、生物膜的空间分布、基因表达和抗菌物质的临床前检验。

二、龈上菌斑生物膜体内形成实验

口腔环境的复杂性和其内微生物群的变异,使得目前仍没有一个实验模型可以精确模拟口腔环境。龋病和牙周病的有效治疗取决于菌斑生物膜结构的精确研究。因此,原位生物膜的临床检查和其对抗菌物质反应的研究具有重要意义。从 20 世纪 80 年代至今,研究者们建立了多种口内模型系统以观察原位菌斑生物膜,包括菌斑生长在塑料成形片上、菌斑生长在带环上、菌斑生长在黏附于牙齿上的釉质片上和多种不同形态的口内装置上。其中,以下 3 种口内模型应用较多:

1. Martinhon 等设计了一个体内收集龈上菌斑的装置。该装置有数个 4mm 深的凹槽,将牛切牙的釉质片制作成厚 2.5mm 的条形置于凹槽内,槽内留有 1.5mm 的空间以收集菌斑,凹槽表面以塑料网覆盖保护。将该装置置于上颌尽可能靠近前牙。可在不同时间取釉质片,体内研究钙、铁和氟化物等对釉质和菌斑的影响。

2. Auschill 等设计了一个类似 Martinhon 的体内龈上菌斑收集上颌装置。该装置由 6 个玻璃片或釉质片以黏蜡粘于装置的凹陷处,正对牙齿以收集邻面的菌斑。该模型可用于研究菌斑生物膜的结构和不同抗菌物质对牙菌斑生物膜的影响。

3. Wood 等将尼龙环粘于釉质片上,然后将釉质片用复合树脂粘于志愿者第一磨牙或第二磨牙上。目前,该装置已广泛应用于牙菌斑生物膜体内自然形成的动态研究和收集。

三、龈下菌斑生物膜模型

由于龈下营养物质的种类和数量、所受机械剪切力(如舌头摩擦、进食粗粮、刷牙和液体流动)、pH、氧张力等与龈上显著不同,其内的微生物种群及数量也明显不同于龈上。龈下牙菌斑生物膜模型的建立相对困难。目前,建立的大多数牙菌斑生物膜模型都是龈上菌斑,而很少有模型适用于龈下菌斑的研究。

Walker 等用 10% 的无菌唾液包被羟磷灰石片,然后将羟磷灰石片置于含有胰蛋白胨大豆肉汤培养基的平底组织培养皿中,再接种从非进展性牙周炎患者获得的弥散性龈下菌斑,厌氧培养,每 48 小时转至新鲜培养基,直至生物膜形成达稳态(约 10 天),建立了一种龈下牙菌斑的体外形成模型。该模型可获得非均质的多菌斑生物膜,菌斑生物膜包括了和龈下菌群相关的 15～20 菌种,有革兰阳性和革兰阴性菌。该模型形成的生物膜和可培养的龈下菌斑在组成上较为接近。该模型简单,重复性高,获得的菌斑具有多样性,可作为一个有效的模型用以研究龈下菌斑生物膜的定植和发展。

Hope 等用 CDFF 建立了一种龈下菌斑模型。该模型是将羟磷灰石片置于 CDFF 的样本盘中并将 CDFF 与 80% N_2、10% CO_2、10% H_2厌氧气体联通形成低氧条件。将来自牙周炎患者龈下菌斑样本混合后加至接种培养基,并以每分钟 0.7ml 的速率输入 CDFF。24 小时后再

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

以每分钟0.1ml的速率输入类似于人工龈沟液的生长培养基。该模型可用于龈下菌斑结构和活性的研究，但是要维持一个厌氧的CDFF装置较为复杂。

第四节 牙菌斑生物膜结构检测

一、基本生物量的测定

厚度、面积、湿重、干重和密度是牙菌斑生物膜的基本生物量。根据厚度可以估算生物大分子在牙菌斑生物膜中含量、扩散和代谢能力。光学显微镜是最初用来测量厚度的方法：将生长在玻璃等透明载体表面的牙菌斑生物膜固定在微调带有标尺的显微镜载物台上，分别调焦至膜与载体表面，比较前后微调标尺的差值，其结果即为生物膜厚度。对牙菌斑生物膜厚度和面积的精确测定则依赖于共聚焦激光扫描显微镜。对牙菌斑生物重量的测定则可用电子秤来完成。在直接称量去皮重的菌斑生物膜湿重后，经高温干燥后再连续称量，直到重量无变化后去皮重，即可得到牙菌斑生物膜的干重。湿重减去干重可计算出水的体积，可视为牙菌斑生物膜的体积。菌斑生物膜密度是指单位体积生物膜干重，通过厚度、表面积及干重能计算其密度。

二、结构观察和组成分析

牙菌斑生物膜和其他部位生物膜具有相似的结构，为有着三维立体结构的生态系。不同生物量的细菌群体被获得性薄膜和胞外基质包裹着，内部为丰富的大小不等的水性通道所间隔，通道内有液体流动。细菌群体内部几乎无氧，为厌氧生存，而各层水性通道内则发现有效浓度的溶解氧，邻近水性通道的细菌为需氧生存，这使同一生物膜内的不同细菌能和谐地一起生活。

该结构可给菌斑生物膜内不同细菌输送营养物质、清除代谢废物，使细菌发挥各自的致病作用，是不同细菌共同获益的途径。菌斑生物膜具有较强的抵抗力，高黏度的基质具有屏障作用，可耐受干燥。抵抗宿主防御成分或药物渗入，使菌斑对抗菌药物的敏感性降低，还可抵抗流水冲刷。

传统的牙菌斑生物膜结构的观察是用光镜和透射或扫描电镜。虽然图像清晰，立体感强。但存在样本需要脱水、固定、嵌入和染色等处理而造成的结构扭曲及关系改变等问题，一方面制备过程繁琐，更重要的是脱水对生物膜样品的形态改变较大，而且生物膜无法继续培养，不能对其进行实时观察。虽然低温及湿性扫描电镜能让样本在饱和蒸汽压力下保持完整水化状态，能够保持基质完整，不会人为引起生物膜表面收缩的技术，但它无法穿透生物膜观察。

随着共聚焦激光扫描显微镜在口腔医学研究中的应用，已成为研究牙菌斑生物膜的强有力的工具。通过与不同的荧光染色和标记方法相结合后，它不仅可以观察生物膜的三维结构，还可跟踪特定基因在生物膜中的表达情况，测定生物膜内细胞的代谢活性，研究不同突变株在生物膜形成中的作用等。

（一）共聚焦激光扫描显微镜观察牙菌斑生物膜结构

1. 激光共聚焦扫描显微镜（confocal laser scanning microscopy，CLSM） 是在普通光学显

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

微镜的基础上引入共聚焦扫描装置和荧光标记技术，由共聚焦显微镜和飞秒红外激光器Verdi/Mira两部分组成。通过对样品进行分层扫描，并利用计算机软件对图像进行三维重组，获得样本高清晰度的三维立体图像。它具有：①荧光标记的特异性及可定量性；②点光源激光可高效激发特异性荧光，降低对荧光的淬灭，增强侧向分辨率；③共聚焦针孔有效消除了焦平面上下散射光，提高轴向分辨率；④脉冲激光散射和吸收程度小，透射性强，对厚样品的穿透可达400μm；⑤双光子及相对较低平均功率的红外激发，减低了对活细胞的损伤；⑥荧光激发高度聚焦在焦点处，可避免焦点以外的光漂白(photobleaching)和光毒(cytotoxicity)作用，延长观察时间；⑦多荧光通道，可以同时检测不同波长的荧光并实时记录等显著优点。

2. 常用荧光标记和染色方法　可用于激光共聚焦显微镜观察的荧光标记方法有多种，可根据研究的目的和各种荧光标记的特点进行选择。

(1) Live-Dead染色法：Live-Dead染色法是利用LIVE/DEAD® Viability Kits试剂盒来标记细菌中活细胞和死细胞的染色方法(图17-22)，分别有针对真核细胞、真菌和细菌的各种试剂盒。针对细菌的试剂盒包含核酸染料：绿色荧光染料SYTO9和红色荧光染料propidium iodide(PI)。SYTO9可以穿透所有细胞膜，包括健康细胞的细胞膜和死亡细胞的受损细胞膜。而PI只能穿过受损细胞膜，并且极大地减弱SYTO9的作用。因此，两种染料以一定配比使用时，活细胞被绿色荧光标记，而死细胞被红色荧光标记。SYTO9和PI的激发(excitation)和发射(emission)波长分别为480/500nm和490/635nm。这种方法非常简便，对在多种营养条件下生长的生物膜使用都有很好的重复性，而且适用于大量不同的细菌种类。常用来标记细菌生物膜经过特定化学试剂或物理方法处理后的生物膜内细胞的存活状况。该方法虽然简便而且信号强度高，但是需要每次实验都染色，并且染色后生物膜不能继续使用，因此无法用来实时跟踪生物膜形成或瓦解的动态过程。

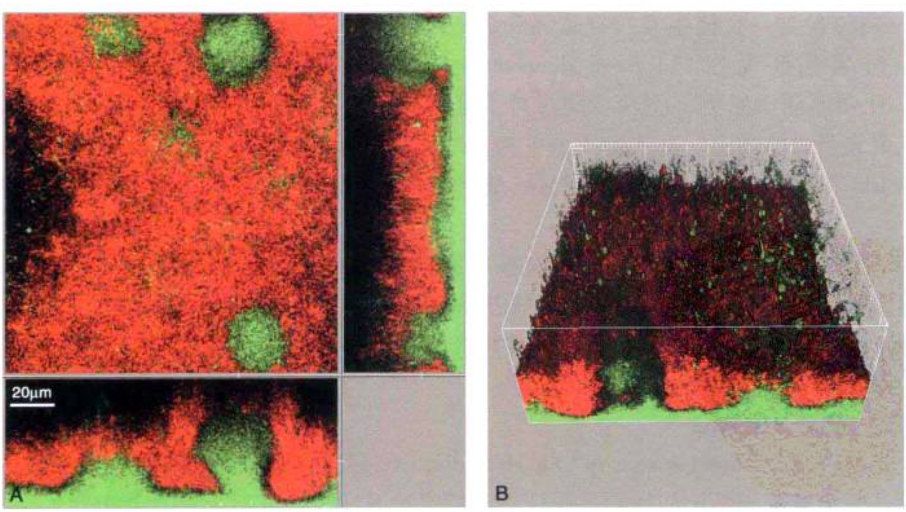


图17-22　铜绿假单胞菌PAO1生长4天的生物膜被羧苄西林处理1天后拍摄的共聚焦激光扫描显微镜照片

注：A. 显示了X-Y轴、X-Z轴(下)和Y-Z轴(右)截面的照片；B. 为复原的三维立体照片

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（2） mini-Tn7 系统：mini-Tn7 系统基于转座子（transposon）Tn7，将单拷贝荧光蛋白基因整合入细菌基因组。经过长时间的实践和改良，已经成为一个非常成熟的方法。Mini-Tn7 具有广泛的宿主范围，目前已经在超过 20 个细菌中被成功使用。这个系统具有操作简便、转化效率高和稳定性好的特点。其中的 TnABCD 转座酶可以高效催化外源基因以特定方向插入细菌染色体特定的 Tn7 attachment（attTn7）位点。在绝大部分细菌中，这个位点位于高度保守的编码甘露醇-6-磷酸合成酶的 *glmS* 基因的下游。

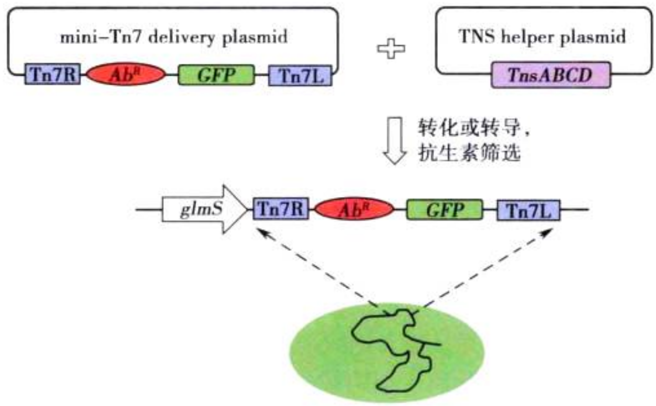


图 17-23　利用 mini-Tn7 在细菌染色体特定位点插入绿色荧光蛋白

注：Tn7R 和 Tn7L 标记 Tn7 的右侧和左侧末端；Ab^R 为用于筛选的抗生素抗性基因；*GFP* 为插入的外源绿色荧光蛋白基因；*TnsABCD* 为编码转座酶的基因

Mini-Tn7 系统由 2 个部分组成：mini-Tn7 delivery 质粒和 TNS helper 质粒。Mini-Tn7 delivery 质粒包含一个抗生素抗性基因和多克隆位点用来插入外源基因，图 17-23 中外源基因编码绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）。TNS helper 质粒含有编码 TnsABCD 转座酶的基因。将两者同时转入受体菌细胞内，通过抗生素筛选，就得到了标记有绿色荧光蛋白的细菌。这样插入的单拷贝基因非常稳定，可以在没有抗生素压力的环境下复制 100 代而不丢失。如果需要的话，编码抗生素抗性的基因可以进一步通过同源重组去掉。

Mini-Tn7 系统标记的生物膜还可以和 PI 同时使用，分别观察活细胞和死细胞的分布情况。图 17-24 显示了大肠埃希菌突变株在用绿色荧光蛋白标记后用多黏菌素 E（colistin，也称 polymyxin E sulfate）处理不同时间后的共聚焦激光扫描的照片，我们可以看到大肠埃希菌生物膜细胞从外到内逐渐死亡的动态过程。

（二）荧光原位杂交

荧光原位杂交（fluorescence in situ Hybridization，FISH）是一种非常成熟的荧光标记方法。通过一个被荧光标记的特异性探针检测特定种属细菌是否存在及其分布和生长的状况等，已经被广泛用于诊断和科研中。FISH 的基本原理是：用已知的荧光信号分子标记单链核酸（一般为 DNA）为探针，按照碱基互补的原则，与待检样品中未知的单链核酸进行结合，形成可被检测的杂交双链核酸。细菌学常用的 FISH 是以 16S RNA 为靶点，不同探针可以

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

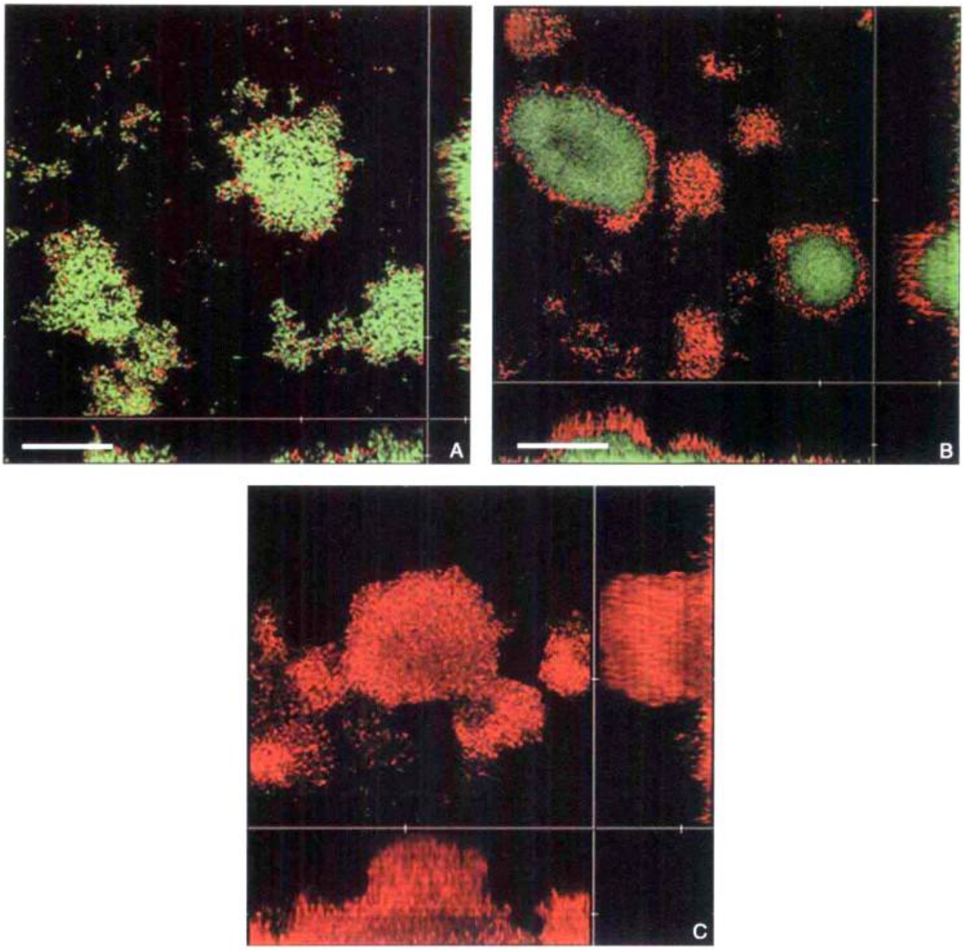


图 17-24　绿色荧光蛋白标记的大肠埃希菌突变株在被浓度为 25μg/ml 多黏菌素 E 处理 0 小时(A)、6.5 小时(B)和 24 小时(C)后用 PI 染色的共聚焦激光扫描显微镜的照片

注:白色标尺表示 300μm

特异性标记不同种属的细菌细胞。实验时要用交联剂先将样品固定,然后加入探针,并使探针在适当的条件下和目标的 DNA 或 RNA 杂交,之后再洗去非特异性杂交的探针(图 17-25)。由于 DNA 与 RNA 杂交时会产生静电排斥,两者结合的强度会被减弱,因此人们在 FISH 探针上进行了诸多改进。肽核酸(peptide nucleic acid,PNA)探针是其中应用广泛的一种。它是寡核苷酸的模拟物,它的糖-磷酸骨架被不带电的 N-(2-氨基乙基)甘氨酸骨架所代替。尽管肽核酸在结构上相对寡核苷酸有了显著的改变,但其与互补核酸之间的结合仍遵循碱基互补配对原则,肽核酸为模板的探针具备了一些单链核酸探针无法比拟的特性,比如:比天然核苷酸具有更高的亲和力;有较强的抗核酸酶和蛋白水解酶降解的能力等。在生物膜的研究中,FISH 常被用来直接观察生物样品中细菌生物膜的形态,并且可以同时检测多种属细菌。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

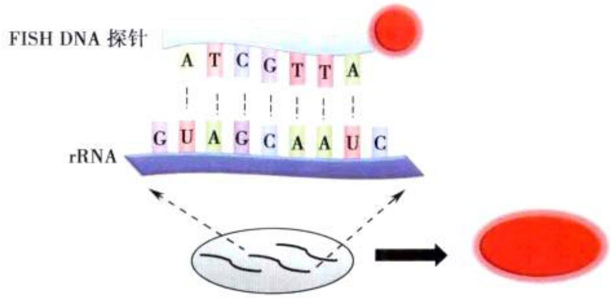


图 17-25 针对 rRNA 的荧光原位杂交原理示意图
注:FISH 探针为与红色荧光团偶联的单链 DNA 片段

(三) 利用 COMSTAT 软件对生物膜进行定量分析

共聚焦激光扫描显微镜拍摄的三维立体图片除了具有形象生动的特点,也可以用软件对图像进行定量分析。COMSTAT 是最常用的软件之一,由丹麦技术大学 Søren Molin 的研究小组于 2000 年开发并使用,之后不断改进。它最初是一个基于 Matlab 的软件,新版的 COMSTAT2 可以在 java 下运行,操作更加简便,详细内容可以在其网站 http://www.comstat.dk/获得。COMSTAT 可以通过原始横截面照片,分析样品立体结构的厚度、粗糙度、群落生物量(biomass)、表面覆盖度、比表面积等十几个参数进行定量分析,同时进行统计学分析,用来对不同的生物膜样本进行较精确的比较。同时,它也可以对多个颜色的生物膜图形进行分析,同时获得两种颜色标记的细胞群体的相关数据。因此,这是一个功能强大的分析工具,在生物膜研究领域中非常有用。

第五节 生物膜胞外聚合物的检测

生物膜中胞外聚合物(extracellular polymeric substances,EPS)是一种在生物膜中,使细胞与其他物质凝聚、结合在一起的有机聚合物,主要黏附在微生物生物膜周围,保证生物膜功能及完整性的物质。EPS 是三维的、胶样的、高度水合的混合物,附着在细菌表面或围绕在细菌周围,水道、孔隙穿通其间,就形成了特征性的蘑菇状生物膜结构。EPS 与胞外基质(extracellular matrix)是一个概念,主要来源于细菌的分泌、细菌表面物质的脱落、细菌溶解以及对周围环境物质的吸附。EPS 由多种有机高分子物质组成,包括多糖、蛋白质、核酸、磷脂、褐藻酸、腐殖质等以及其他多聚混合物,其中也不乏一些低分子无机物,如硫酸盐等,它们在某种程度上可极大地改变生物膜的结构与物理化学性质。EPS 的糖类主要包含单糖、糖醛酸、氨基糖等;磷脂类包含脂肪酸、甘油、磷酸酶、氨基乙醇、丝氨酸、胆碱等;腐殖质类包含酚类混合物等。不同种类的微生物群体,EPS 成分有所不同。EPS 在细菌微生物群体中广泛存在,在细菌的黏附聚集、空间构型、细菌间信息交流、耐药性、抗毒性等方面起着重要作用。

EPS 的检测技术主要有破坏性及非破坏性分析两种。破坏性分析主要指通过各种方法提取出 EPS 主要成分,再运用各种技术对提取物进行分析研究。在非破坏性分析主要依赖于电子显微镜、扫描探针技术、磁共振光谱法、共聚焦激光扫描显微镜等。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

一、EPS 破坏性分析

（一）EPS 提取方法

EPS 提取方法可以大致分为物理法、化学法和物理化学综合法三大类。

1. 物理法提取 EPS　物理法主要是利用各种物理技术增强 EPS 各成分在溶液中的溶解度，以达到分离提取各成分的目的，主要包括：①超声提取法：该方法是利用超声波在生物膜样本中形成孔穴，在超声压力冲击下促进 EPS 中各成分的溶解。②超声离心法：生物膜样本经超声处理后，再结合低温高速离心，在超声冲击和离心重力场共同作用下，促进 EPS 中各成分溶解。但该方法会导致大量的细菌渗漏，能提取样本量也少，主要成分为蛋白和胞内物质。③蒸汽提取法：该方法利用蒸汽的热量与压力，促进生物大分子的运动，从而增加其在溶液中的溶解度而达到提取与分离的目的。该方法会对生物膜细菌产生最大程度的破坏，细胞大量溶解，得到的样本蛋白、糖和总有机碳含量较高。④常规离心提取：该方法简单适用，利用离心力场作用，促进 EPS 中各成分在溶液中的溶解度，通常在 12 000r/min，室温离心 30 分钟即可达到分离提取目的。

2. 化学提取 EPS　该方法是利用萃取剂与 EPS 中生物大分子结合，提高它们的水溶性而达到分离提取的目的。①碱提法：基本原理是利用蛋白易于溶解在碱性溶剂中的原理。生物膜样本经 2000r/min 离心 20 分钟后，弃上清废液，再加入 2ml 2mol/L 的 NaOH，经 20℃搅拌 5 小时后，用水稀释到原体积，可以高效提取到 EPS 样本。该方法对细菌的破坏作用也较大，得到的样本中糖含量也较高。②DTA 法提取：在生物膜样本中加入 2% EDTA，4℃静置 3 小时，13 500r/min 离心 20 分钟即可得到生物膜 EPS。同碱提法，蒸汽提取法同样会导致大量细胞渗漏。③酸缓冲液提取法：在生物膜样本中加入一定量的磷酸盐缓冲液（pH = 7.0，0.01mol/L），在 70℃水浴中以 100r/min 速度搅拌 2 ~4 小时，可使 EPS 从生物样本中分离出来。④Tris/HCl 提取法：在生物膜样本中加入一定量 Tris/HCl 缓冲液（pH = 7.0，0.1mol/L），在 80℃水浴 1 ~2 小时，可使 EPS 从生物样本中分离出来。⑤离子交换树脂提取法：在生物膜样本中加入提取缓冲液（2mmol Na_3PO_4，4mmol NaH_2PO_4，9mmol NaCl，1mmol KCl），然后再加入 Dowex 离子交换树脂（50X8，Na^+，20 ~50 筛，Aldrich-Fluka 44，445），-4℃搅拌 2 小时。该方法同样会导致生物膜细胞渗漏，提取样本中总有机碳含量较高。⑥醛提取法：生物膜样本用含 0.22% 甲醛的 NaCl 混合，在 12 000r/min 离心 30 分钟。该方法对细胞破坏作用小，提取的样本中主要为糖和少量蛋白。⑦二醛提取法：在生物膜样本中加入 3% 的戊二醛溶液，4℃搅拌过夜。戊二醛可以保护细胞膜，避免细胞壁变形和渗漏。对细胞破坏作用小，提取物中主要成分为糖类。二醛提取法是目前最为理想的 EPS 提取方法。

（二）提取 EPS 的分析

提取的 EPS 经微孔滤膜过滤后，根据不同的提取方法、要分析的目标，选择不同的方法进行分析。

1. 蛋白分析　对 EPS 中蛋白可采用考马斯亮蓝、ABC 染色、SDS-PAGE、紫外分光光度计、高压液相质谱仪等进行定量和定性分析。

2. 糖分析　对 EPS 中的糖可采用酚-硫酸比色法、热解-气相色谱-质谱法进行定量和定性分析。

3. DNA　可采用 PCR、DAPI 染色和紫外分光光度计进行定量和定性分析。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

EPS 破坏性分析虽然有利于 EPS 主要成分的深入研究，但对 EPS 造成了不可逆的破坏而不利于动态观察。

二、EPS 非破坏性分析

对 EPS 非破坏性分析主要依赖于电子显微镜、扫描探针技术、磁共振光谱法、共聚焦激光扫描显微镜等设备，在不破坏 EPS 结构的情况下进行定性和定量分析。

1. 激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope，CLSM)　与不同荧光探针合用，对生物膜的成分进行原位非损伤性观察，不仅揭示了生物膜的结构呈三维蘑菇状，其间布满水道、孔隙，而且发现该结构呈现空间和时间的多样性。生物膜中 EPS 的分布和组成极大地影响着这种多样性。

Adav 选用 7 种不同的荧光染料，即标记核酸的 SYTOX 蓝、标记脂质的尼罗红、标记 B-多糖的卡尔科弗卢尔白、标记 A-聚糖的伴刀豆球蛋白 A、标记蛋白的异硫氰酸荧光素、标记活细胞的 SYTO63、用于监测钙水平的钙绿，对 EPS 的不同成分进行原位杂交标记后，采用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)和 MATLAB 软件，可对 EPS 进行定位、定量分析。

2. 拉曼显微镜技术(RM)分析　RM 技术分析 EPS 是 Ivleva 开发出的一种无需标记的极有潜质的非破坏性检测 EPS 的技术。主要原理为：RM 可与各种不同结构的生物膜相互作用，分析其化学成分及提供化学相关信息，其结果与 CLSM 分析结果有着较好的一致性，将两者联合更有利于生物膜成分复杂结构的深入研究。

3. 透射电镜　镧固定处理黄色黏球菌后用透射电镜观察发现，EPS 围绕在细菌周围并呈高电子密度的纤维网格状结构。

上述检测技术均有利于直观认识 EPS 的形态和结构，并能在各种处理下对 EPS 进行较好的动态追踪及观察。但是，在未知生物膜 EPS 主要成分的情况下，所选用的标记物能否特异性地结合目标物质以及能否得到较全面的标记物对 EPS 各种成分进行标记等问题。

第六节　口腔微生物毒性因子的检测

构成细菌毒力的物质称为毒力因子(virulent factor)，主要有侵袭力和毒素。

侵袭力：病原菌在机体内定植，突破机体的防御屏障、内化作用，繁殖和扩散，这种能力称为侵袭力。

毒素：细菌毒素按其来源、性质和作用等的不同，可分为外毒素和内毒素两大类。在大多数情况下，外毒素一般简称毒素。

一、细菌侵袭性检测

(一) 细菌黏附能力检测

口腔微生物致病首先是其黏附在牙表面，对微生物黏附能力的检测通常采用放射性核素标记的方法。

将细菌接种于 TSB(pH 6.2)培养液中，微需氧 37℃培养 18 小时，转种于含 0.259GBq/L ^{3}H-胸腺嘧啶核苷的 TSB 培养液，微需氧 37℃培养 18 小时标记。并悬浮于含 5g/L 牛血清清

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

蛋白的0.05mol/L PBS缓冲液中，用721分光光度计调整细菌浓度A540为1，备用。将牙本质微粒或羟基磷灰石置于小试管中，用0.05mol/L PBS缓冲液浸泡过夜、吸干，加唾液200μl包被，37℃ 100r/min振荡1小时后，用0.05mol/L PBS缓冲液洗涤3次；再加入200μl含5g/L牛血清白蛋白的0.05mol/L PBS缓冲液，37℃ 100r/min振荡1小时，0.05mol/L PBS缓冲液洗涤3次、吸干。随后将标记^{3}H-胸腺嘧啶核苷的生活和灭活细菌分别接种于含牙本质微粒或羟基磷灰石的小试管中，一起37℃ 100r/min振荡孵育1小时。用0.05mol/L PBS缓冲液洗涤3次、吸干，将牙本质微粒、羟基磷灰石转移到闪烁液中，样本在YSJ-1液体闪烁计数器中测定放射性核素放射量，计算黏附百分率。

（二）细菌对细胞的侵袭实验

细菌经集菌培养后，以1.0ml含小牛血清的1640液悬浮细菌，使细菌浓度约为107CFU/ml。在6孔细胞培养板中加入经消毒处理的盖玻片，细胞经RPMI 1640洗后，加入含小牛血清的1640液和0.1ml上述制备好的菌悬液（9∶1体积比），轻轻摇晃混匀。于二氧化碳孵箱，37℃培养。

1. 黏附试验　37℃培养3小时后，取出盖玻片，晾干，甲醇固定15分钟，吉姆萨染液染色。干燥后镜下观察，计数50个细胞黏附的细菌数，计数平均值。

2. 侵袭试验　37℃培养3小时后，加含100μg/ml庆大霉素的1640液2ml，37℃培养1小时。再用RPMI 1640洗3次，取出盖玻片，晾干，甲醇固定15分钟，吉姆萨染液染色，干燥后镜下观察，计数50个细胞侵袭的细菌数，计数出平均值。

（三）细菌抗吞噬作用检测

机体内的吞噬细胞主要有中性粒细胞和巨噬细胞，口腔微生物抗吞噬功能是其致病因素之一。

血液中的单核细胞移动到组织中称为巨噬细胞，而中性粒细胞正常情况下位于血液中，当口腔致病菌突破口腔黏膜屏障侵入口腔组织后，既可以被巨噬细胞吞噬，同时细菌产生的LPS等对中性粒细胞具有强烈的趋化作用，引诱中性粒细胞渗出，参与对细菌的吞噬和杀灭。常用葡萄球菌作为阳性对照，检测口腔微生物的抗吞噬功能。主要步骤：

1. 在4支1.5ml试管中各加入2～3滴3.8%枸橼酸钠抗凝人外周血（中性粒细胞）或小鼠腹腔液（巨噬细胞）。分别加入常规培养的待实验菌和葡萄球菌液一滴。置37℃水浴箱水浴15分钟。

2. 样品可取血半滴于载玻片上，瑞氏染色镜下观察，或者直接用电子显微镜观察。

3. 油镜观察　中性粒细胞细胞核及被吞噬的细菌染成紫色，而粒细胞的细胞质则为淡红色（图17-26）。

4. 吞噬百分率　观察100个中性粒细胞，计算其中吞噬有细菌的中性粒细胞数，计算出吞噬细胞百分率。

5. 吞噬指数　观察100个中性粒细胞，计算其中被吞噬的细菌总数，平均每个中性粒细胞吞噬的细菌数。

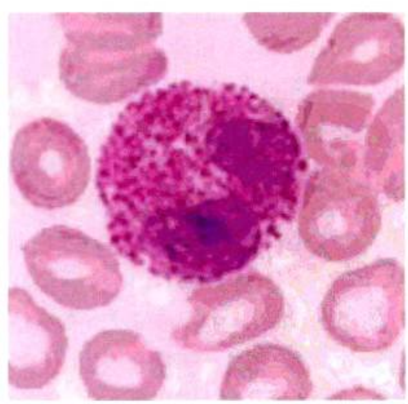


图17-26　中性粒细胞吞噬细菌（油镜）
注：该图片来自：中国免疫学信息网

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

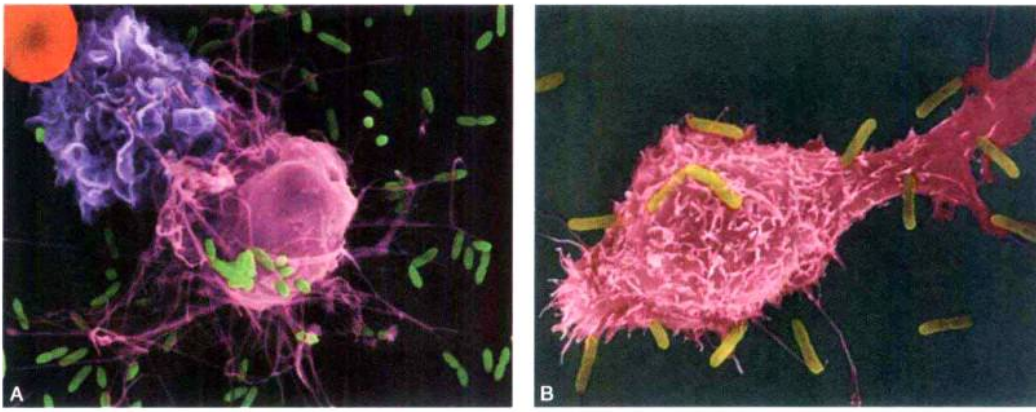


图 17-27 巨噬细胞吞噬细菌(电镜)
注:图片来自:中国免疫学信息网

二、细菌内毒素的检测

细菌内毒素是革兰阴性菌细胞壁上的一种脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和蛋白的复合物,当细菌死亡或自溶后便会释放出内毒素,是口腔病原微生物主要毒力因子之一。内毒素大量进入血液就会引起发热反应——“热原反应”。内毒素的快速检测可用厦门鲎试剂厂微板鲎试仪 Elx808(配套 IU)及配套软件(细菌内毒素分析仪)配合 2005 药典收录的光度法鲎试剂(动态浊度法鲎试剂、显色基质鲎试剂、动态显色法鲎试剂)。常用的方法有:

1. 凝胶法　通过鲎试剂与内毒素产生凝集反应的原理来定性检测或半定量内毒素的方法。该方法通过观察有无凝胶形成作为反应的终点。操作简单,经济,不需要专用测定设备,可以进行定性或半定量测定。

2. 终点浊度法和动态浊度法　此 2 种方法均利用检测鲎试剂与内毒素反应过程中的浊度变化而测定内毒素含量。动态浊度法(又称动态比浊法)是检测反应混合物的浊度上升某一预先设定的吸光度所需要的反应时间,或是检测浊度增加速度的方法。

3. 终点显色法和动态显色法　都是属于显色基质法。利用鲎试剂与内毒素反应过程中产生的凝固酶使特定底物显色释放出的呈色团的多少而测定内毒素含量。根据产物颜色判断内毒素浓度,又称为比色法。

4. ELISA 法　目前已有市场化的检测样本 LPS 的 ELISA 试剂盒。用纯化的人脂多糖(LPS)抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入脂多糖(LPS),再与 HRP 标记的脂多糖(LPS)抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的脂多糖(LPS)呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中人脂多糖(LPS)浓度。

实验过程中可根据已有的研究条件和目的选择检测方法。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

三、侵袭酶活性测定

（一）胶原酶活性测定

胶原是牙周组织的重要组分，其中 80% 以上为Ⅰ型胶原。牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonasgingi valis*，Pg）是慢性牙周炎（chronicperiodontitis，CP）主要的病原菌，可产生主要降解Ⅰ型胶原的胶原酶。Pg 胶原酶由 *prtC* 基因编码，全长 1002bp，编码 333 个氨基酸组成的相对分子质量（Mr）约为 38×10^3 的多肽。对胶原酶的检测可用常规的 PCR、Western blot、ELISA 等方法在基因和蛋白水平定性和定量分析外，重要的一点是对胶原酶活性的检测。

对于胶原酶活性的测定方法较多，如黏度法、放射性核素法、荧光法、酶联法以及考马斯亮蓝法等。在诸多的方法中，因 C^{14} 标记的可溶性胶原为底物的放射性核素测定方法灵敏度高而应用较广泛。但由于该方法需要严格的操作环境（C^{14} 的半衰期为 1452 年）限制，难以广泛应用。目前国内常用的是氨基酸分析仪测定羟脯氨酸含量反应胶原酶活性，方法简便、无害、灵敏、重复性好。

该方法利用 50% 的二噁烷可沉淀未变性的胶原，而不能沉淀变性的胶原的原理，按照 Terato K(3) 的方法将酶-底物作用后的变性与未变性胶原分离，测定上清中羟脯氨酸的含量，反映上清中存在的被水解的胶原量，也代表了胶原酶的活性。其简要步骤为：

空白管　0. 1M Tris-HCl　200μl + 样品200μl
试验管　0.2% 胶原 200μl + 样品200μl
↓ 35℃，24小时或更长
0.08MO-二氮杂菲20μl
↓
400μl二噁烷，冰浴中混匀，5分钟
↓
离心、1500g，10分钟
↓
取上清(-20℃备用)

上清经 12mol/L HCl 在真空、高温（110℃±1℃）下水解 24 小时。去 HCl、过滤后于高效氨基酸分析仪测定羟脯氨酸浓度。测定条件：分离柱 100mm×2. 8mm；流速 Na-A 14ml/h；茚三酮 6ml/h；柱温 48℃；进样量 50μl/次；比色波长 570nm。

（二）变异链球菌葡糖基转移酶活性测定

变异链球菌（以下简称变链菌）对牙面的黏附和定居是致龋的始动因子。变链菌所产生的葡糖基转移酶（glucosyltransferase，GTF）被认为是主要的致龋毒力因子之一。GTF 活性测定是利用 GTF 能以蔗糖为底物，合成水溶性和水不溶性葡聚糖的原理。在蔗糖底物溶液中加入 GTF 样本，经 37℃反应 2 小时后离心收集反应合成的 ISG，再用蒽酮法测定 ISG 含量，以此计算 GTF 活性。

近年来，R&D Systems 已开发出一种多功能的非放射性糖基转移酶活性测定方法（图 17-28）。该方法使用了一种特定的磷酸酶，在释放糖基转移酶反应过程中产生的核苷酸上的磷酸。随后利用孔雀石绿磷酸盐检测试剂来评估磷酸盐水平。因为释放的磷酸盐浓度与

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

转移的糖分子量呈正比，所以可测定糖基转移酶的动力学参数。此外，这种显色分析在96孔板中开展，适合高通量研究。

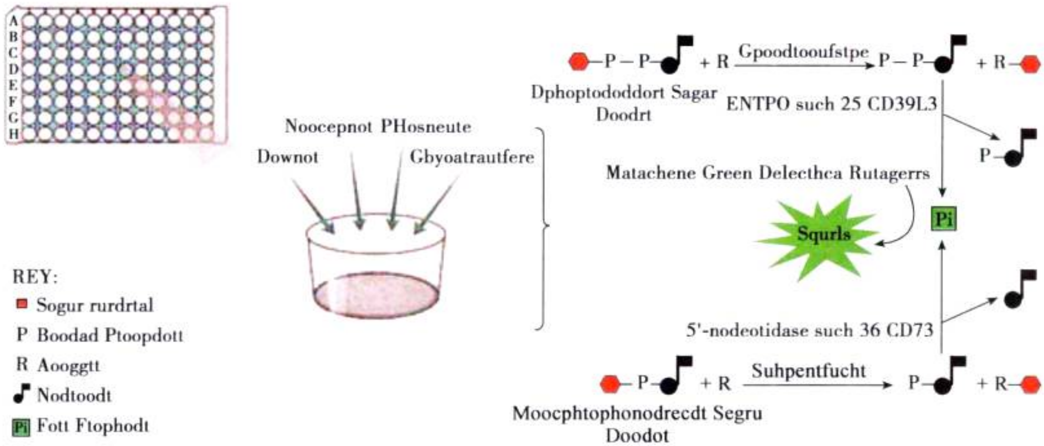


图 17-28　糖基转移酶活性测定

注：该图片来自：R&D Systems 网站

（三）牙龈素活性测定

牙龈素是存在于 P. g 外膜、膜泡或胞外的一组蛋白酶，属于半胱氨酸蛋白酶，具有梭菌蛋白酶的一些特征。牙龈素可分为2组：一组为精氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶，另一组为赖氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶。国际生化联合会将它们分别命名为牙龈蛋白酶 R（gingipain R，Rgp）和牙龈蛋白酶 K（gingipain K，Kgp）。①Rgp 活性测定：利用 Rgp 特异性水解精氨酸的原理，以苯甲酰-L-精氨酸对硝基苯胺为底物。在底物、Tris-HCl 缓冲液（pH7.5）、Triton X-100、DTT，混合液中加入待测样本，混合后37℃温浴30分钟，加0.2ml 50%醋酸中止反应；迅速摇匀后静止10分钟。降解0.01mol 对硝基苯胺为一个 Rgp 活性单位。②Kgp 活性的检测：向待检样品中加入缓冲液（200mM Tris-HCl，100mmol/L NaCl，5mmol/L $CaCl_2$，10mmol/L 半胱氨酸，pH 7.6），37℃预孵育5分钟，加入0.5mmol/L 底物（N-p-硝基苯胺乙酸盐），分光光度计405nm 波长下测定生成 p-硝基苯胺的 OD 值。以降解0.01mol 底物为一个 Kgp 活性单位。

四、其他毒力因子检测

口腔病原微生物致病因素还有很多，如白细胞毒素、牙龈卟啉单胞菌外膜蛋白、菌毛等。对这些蛋白的检测，包括胶原酶、葡糖糖基转移酶、牙龈素等。通常可以在基因和蛋白水平进行。常用的方法是根据蛋白的基因序列，设计特异性引物，用常规 PCR、反转录 PCR 或荧光定量 PCR 方法，在基因水平对其进行定性和定量分析。也可以用 ELISA 或 Western blot 在蛋白水平进行定量检测。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第七节　口腔微生物蛋白质组学

随着人类基因组计划的完成，功能基因组学研究日益深入，蛋白质组学成为人们研究的热点。蛋白质组学(proteomics)是指以蛋白质组为研究对象，从整体的角度，分析细胞内动态变化的蛋白质组成与活动规律的一门学科。经典的蛋白质学限定为蛋白质的相关研究，随着蛋白质组学研究的深入和人类基因组计划的发展，这一定义显然有其局限性。现代蛋白质组学的研究范围发生了相应的扩展，广义的现代蛋白质组学不仅仅研究所有的蛋白，同时也将蛋白质研究与基因水平的研究加以整合，包括 mRNA 分析、基因组分析、酵母双杂交等。不管广义或狭义的定义，蛋白质组学的目的是通过研究细胞表达的所有蛋白以全面系统地解密生命现象。如图 17-29 所示，蛋白质组学不是一个封闭的、概念化的、稳定的知识体系，而是一个领域。它旨在阐明生物体全部蛋白质的表达模式及功能模式，其内容包括蛋白质的定性鉴定、定量检测、细胞内定位、相互作用研究等，最终揭示蛋白质功能，是基因组 DNA 序列与基因功能之间的桥梁。

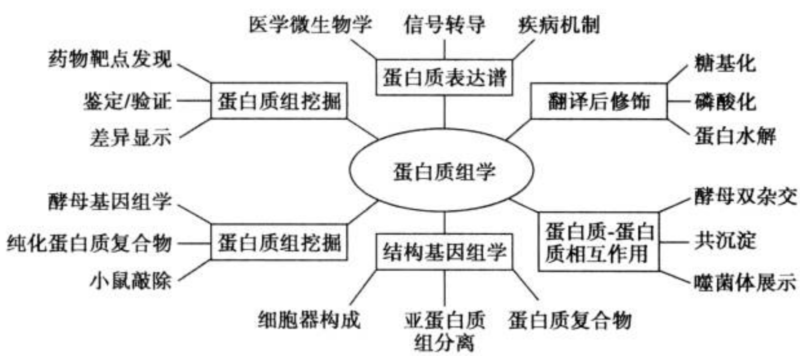


图 17-29　蛋白质组学分类及在生物学中的应用

微生物蛋白质组学可包括两方面的内容：一是微生物蛋白质表达模式（或蛋白质组组成）的研究，它的目的是对蛋白质组组成的分析鉴定，是蛋白质组学中的与基因组学相对应的主要内容。它要求对蛋白质组进行表征，即实现所有蛋白质的分离、鉴定及其图谱化。另一部分是对微生物蛋白质组功能模式的研究，目前主要集中在蛋白质相互作用的研究。而差异蛋白质组学是前者的重要部分，它是运用蛋白质组的研究手段，通过对正常状态和病理状态下微生物蛋白质表达数量和种类的差异比较，发现与这种病理状态或疾病相关的特异蛋白质，阐明口腔感染性疾病的发生机制，筛选特异性标记物，这对口腔微生物疾病的诊断、预防与选择抗生素都有极大的意义。

微生物蛋白质组研究一般是先从细胞、组织或体液等生物样品中提取微生物蛋白质，经二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis，2-DE)分离、染色，得到蛋白质表达谱。将 2-DE 电泳结果通过图像扫描仪进行数字化，建立双向凝胶电泳图谱。将不同组织、不同细胞表达的蛋白质图谱进行比较。运用软件对凝胶图谱去除纹理及背景，生成配对胶可对差异蛋白点进行定性和定量分析。随后对胶上蛋白质点直接进行蛋白质酶切，回收酶切片段

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

测定肽质量指纹图谱或测定肽序列，进行数据库检索实现蛋白质的鉴定。因此，蛋白质分离（如双向电泳技术）、鉴定（如质谱技术）、生物信息学是蛋白质组研究的关键技术。生物信息学的研究技术主要包括生物分子信息的检测、分析、储存与应用，与蛋白质组学相关的主要是蛋白质序列数据库。目前有 PIR（protein information resource）-PSD（protein Sequence database）蛋白质序列数据库，该库收录了大量序列信息。在蛋白质结构域方面最为详尽的是 InterPro，它集成了 Pfam、Prosite、PRINTS、SMART、Prodorm 等数据库。

一、双向凝胶电泳分离蛋白质

蛋白质的分离方法有多种，包括双向凝胶电泳、双向荧光差异凝胶电泳、蛋白质芯片、层析技术等，其中双向凝胶电泳是蛋白质组学研究的核心技术之一（表 17-1）。

表 17-1 不同蛋白质分离方法的比较

方法	原理	优点	缺点	应用
2-DE	依据蛋白质所带电荷量和蛋白质分子量大小的不同进行双相分离	分辨率最高，信息量的电泳技术	疏水性蛋白溶解性差，低分子量的蛋白检出率低，结果重复性和组间可比性差	蛋白组研究中蛋白分离的传统方法
DIGE	2-DE 的改进技术，原理基本与之相同	独特的"CyDye"DIGE 荧光素进行蛋白标记消除实验偏差并保证精确胶内匹配	仪器及消耗品（荧光染料）昂贵	有望替代传统 2-DE 技术
抗体微阵列	将大量抗体铺于固相载体上形成阵列，通过抗原抗体反捕获分离出靶蛋白	特异结合，无需特殊处理，样品用量小，多元样品同时检测	需已知抗体的存在，未知蛋白的筛选难以完成	临床诊断和新药开发中的蛋白分离
高效液相色谱	以液相色谱为基础，引入气相色谱理论方法，采用高效固定相发展而成的分离分析技术	快速、重现性好、易于实现自动化	多组分蛋白质样品的多维层析极其费时，实用价值较小	可望在应用多维联用技术分析研究蛋白质组这一领域有所突破

（一）双向凝胶电泳（2-DE）

双向凝胶电泳技术是蛋白组学中应用最成熟的一种蛋白质分离技术，它依据蛋白质的特性进行双相分离。第一相依据蛋白质所带电荷量的不同，用等电点（PI）聚焦技术分离蛋白质。第二相是依据蛋白质分子量大小的差别，通过蛋白质与 SDS 形成复合物后，在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移速率不同达到分离蛋白质的目的。双向电泳具有极高的分辨率和灵敏度，可以同时显示组织或细胞内各种蛋白，使它在了解细胞活动全貌方面具有无与伦比的优势。但是，传统的双向电泳技术也有明显的缺点，如耗时、操作难度高；动态范围有限，分子量过大（>100 000）、过小（<10 000）不适于此法分离检测；一些疏水性膜蛋白（常常是很多药物作用的靶点）制备时溶解性差；胶与胶之间可比性差；对于极酸、极碱性蛋白、疏水蛋白、低丰度蛋白效果欠佳，大大地限制了其在蛋白质组学研究中的应用。双向电泳也有很大革新，

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

商品化的预制胶条使得其重复性增加。同时，梯度离心、分步连续提取等策略的应用使根据溶解性的差别把蛋白分为可溶性蛋白、膜蛋白和沉淀蛋白，分别采用由弱到强的样品提取液，这一策略成功运用于膜蛋白的提取。也有人对 2-DE 加以改良，如双向荧光差异凝胶电泳（2-D fluorescence difference gel electrophoresis，DIGE），可对每块双向电泳凝胶上的每一个点采用独特的“CyDye”DIGE 荧光素进行蛋白标记，使不同的 CyDye 标记的样品能在同一块胶上分离，这样保证所有的样品在完全相同的第一向和第二向电泳条件下分离，消除实验偏差并保证精确的胶内匹配。荧光染料标记的双向电泳技术，结合了多重荧光分析的方法。

（二）蛋白质芯片系统

蛋白质芯片（protein chip），或称蛋白质微阵列（protein microarray），是蛋白组分离中非常有潜力的技术，它是生命科学与微电子学等学科相交叉的一门高新技术，具有高通量筛选、高灵敏度检测、全自动化操作等传统方法无可比拟的优势。临床常用的形式与 DNA 微阵列相似，是将不同的蛋白质配体如高亲和力和专一性的抗体、抗原固定在同一载体表面，通过特异的抗原抗体反应分离出相应的靶复合物。目前蛋白质芯片作为蛋白组学研究的分离技术主要用于：①生物标志物的检测：如唾液中与疾病相关的微生物标志物的筛选；②生物分子间的相互作用研究：认清细胞内信号转导和新陈代谢途径；③药物靶标及其作用机制的研究：众多候选化学药物进行筛选，直接分离出与靶蛋白作用的化学药物。应用蛋白质微阵列技术还可以制作诊断性和筛查性芯片。当前，蛋白质芯片主要包括 5 种形式，即固相表面型芯片（plain-glass slide）、毛细管电泳型芯片（chip-based capillary electrophoresis）、微孔型芯片（microwell chip）、液相载体型芯片和细胞组织性芯片。

（三）层析技术

由于高效液相色谱有较高的灵敏度，蛋白质样品不需变性处理可直接分离，并可实现自动上样、自动收集、自动在线分析等功能，因而该技术的应用仍然受到研究者的关注。但是，由于层析技术自身的局限性如层析柱填料对蛋白的吸附，多组分样本的多维分析极其费时，在蛋白质组方面应用价值较小，多维联用技术分析可在蛋白质组这一领域有所突破。

二、质谱分析鉴定蛋白质

（一）质谱分析

质谱和双向电泳技术的结合是现代蛋白质组学研究的基础。蛋白质组学研究上最重要的突破就是用质谱鉴定蛋白。质谱技术是蛋白质组研究中最重要的鉴定技术，其原理是指样品分子离子化后，根据不同离子间的质荷比（m/z）的差异来分离并确定相对分子质量。通常，质谱仪由离子源、质量分析器和离子检测系统三部分组成。其中，质量分析器是质谱技术的核心，目前共有 4 种质量分析器应用于蛋白质组学研究，分别是离子肼（ion trap）、飞行时间（time-of-flight，TOF）、四极杆（quadrupole）、傅立叶变换离子回旋加速器（Fourier transform ion cyclotron，FTIC）。这几种质量分析器的设计原理和效果不同，并且各有自己的优点和缺点。近年在串连质谱（tandem MS）中出现了质量分析器的组合，如三四级杆（triple-quadropole）质谱、四级杆-飞行时间（Q-TOF）质谱、离子肼（ion-trap）质谱等。按照样品分子离子化的方式，质谱又可分为电喷雾离子化质谱（electrospray ionization mass spectrometry，ESI-MS）和基质辅助激光解吸质谱（matrix assisted laster desorption ionization mass spectrometry，MALDI-MS）。ESI-MS 主要是靠强的电场使样品分子离子化，测定相对分子质量数万的蛋白

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

质准确度可达万分之一，并且可与高效液向色谱、毛细管电泳等技术连用。MALDI-MS 是以脉冲离子化方式使样品电离。它常与飞行时间质谱联用，称为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)。近年来，MALDI-TOF-MS 串联质谱分析仪发展迅猛，其数据采集方面的自动化程度、检测的敏感性及效率都大大提高。大规模数据库和一些分析软件(如SEQUEST)的应用使得串联质谱分析仪可以进行更大规模的测序工作。

蛋白质经双向电泳分离及图像分析后，将蛋白质斑点胶块切下，用蛋白酶(常用胰蛋白酶)对蛋白质样品进行胶内酶解，获得肽片段。利用质谱分析肽片段，得到肽指纹图谱。利用生物信息学将质谱分析结果与蛋白质数据库中的氨基酸序列进行比较，如果数据库中有被研究蛋白质的氨基酸序列，则可直接进一步结合已有资料进行分析；如果蛋白质数据库中没有被研究蛋白质的氨基酸序列或者其序列不全，则用 EdmM 降解法测定其全部氨基酸序列，并将氨基酸序列输入蛋白质数据库。

(二) 质谱技术与其他技术的结合

1. SELDI-TOF　表面增强激光解吸离子化(surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI)技术是由美国 Taylor 医学院的 Hutehens 和 Yip 发展，后经 Ciphergen Biosystems 公司进一步研发和商品化。蛋白质芯片是 SELDI 技术的核心部分。这种技术是利用经过特殊处理的芯片表面，根据蛋白质的理化性质，选择性地从待测生物样品中捕获特定类型的蛋白/多肽，将其结合到芯片的固相层析表面，经原位洗脱，与能量吸附分子形成共结晶。结合飞行时间质谱技术，对所结合的多肽或蛋白质进行质谱分析，可以检测到不同蛋白质的相对表达丰度及分子量。SELDI-TOF 质谱技术无需纯化，可直接分析体液样本的优点正好符合临床体液蛋白质组研究的需求。具有灵敏、快速、简便易行、样本用量少和通量高等特点。

2. 多维液相色谱-质谱连用技术　多维蛋白鉴定技术是指多维液相层析(multi-dimensional liquid chromatography)与质谱的联用。通过多种层析方法如离子交换、亲和层析、反相层析的组合使用大大提高了分辨率，可以克服经典的 2-DE/MS 的一些缺点。并与之相互补充，成为蛋白质组学可供选择的另一条途径。特别是纳米流毛细管高效液相层析(cHPLC)与生物质谱(Bio-MS)结合技术的出现，使研究者的注意力又重新聚焦在基于多维液相的蛋白分离。

多维蛋白鉴定技术可保证样品完整性，保证第一向的高上样量及第二向的高灵敏度，保证极佳的保留时间的重复性和极佳的动态范围，这些对检测低丰度蛋白、蛋白磷酸化和其他翻译后修饰至关重要。

(三) 定量蛋白质组学技术

氨基酸稳定放射性核素标记(stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)技术是一种基于稳定放射性核素标记的氨基酸细胞培养策略。它作为目前定量分析误差最小的比较蛋白质组学研究策略而得到广泛的应用。SILAc 技术对于稳定放射性核素标记的氨基酸是有选择的，目前常用的氨基酸是精氨酸和赖氨酸。主要是基于以下因素考虑：在蛋白质组学研究中，胰蛋白酶被广泛使用，其能够高度特异性酶切赖氨酸和精氨酸残基的羧基端，酶切产生的肽段 C 末端(赖氨酸的侧链氨基或精氨酸胍基)在酸性条件下均会带上一个质子，从而确保了一级质谱分析(除蛋白末端并且不含有碱性氨基酸的肽段)的离子化效率及二级质谱分析离子的碎裂。在体内代谢标记技术中，稳定放射性核素标记过程发生在代谢水平，极大地减少了蛋白质提取过程中可能引入的定量误差，同时该标记方法

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

多与高分辨率、高准确度的傅立叶变换离子回旋共振质谱仪(FTICR-Ms)联用。但这种标记策略所使用的富含稳定放射性核素的培养基及氨基酸的费用高昂,这是妨碍其使用的因素之一。

基于巯基反应的亲和标签技术(isotope-coded affinity tags,ICAT),是目前最常用的体外标记技术。相对于体内代谢标记技术,体外化学标记技术具有其自身的特点:①其所使用的稳定放射性核素标记试剂相对便宜;②可选择在蛋白水平或肽段水平对样本进行标记,并且可供选择的标记位点很多,例如氨基端、羧基端及氨基酸残基的侧链基团(赖氨酸的侧链氨基、半胱氨酸的巯基)等;③适用于各种生物样本(包括人体的组织、器官)。半胱氨酸因其强亲核性的巯基,而成为首选的特异标记对象。该技术的ICAT试剂由三部分组成:由生物素构成的亲和标签(用于分离经ICAT试剂标记后的肽段)、连接子(用于整合稳定放射性核素)、特异结合巯基的活性反应基团。ICAT技术对疏水蛋白的标记效果良好。

三、蛋白质组学在口腔微生物研究中的应用

差异蛋白质组学初步应用于龋病、牙周病的病因学研究,主要针对口腔牙周及龋病病原菌进行分析。联合运用微生物基因学及蛋白质组学方法和生物信息学等相关技术,有助于发现口腔病原菌的分子致病机制。从与细菌活动密切相关的功能蛋白研究口腔致病菌的黏附致病途径及相关作用机制,揭示口腔致病菌潜在的功能蛋白和特征蛋白,以期从蛋白途径寻求疾病早期阻断和治疗的方法,这已成为差异蛋白组学应用于口腔病原菌研究的基本模式。

(一)变异链球菌

变异链球菌与龋齿的发生密切相关。产酸和耐酸是变异链球菌的重要致龋特性。变异链球菌在pH 5.2和7.0状态下的菌细胞内可溶性蛋白研究中发现,在低pH条件下,共有30种蛋白发生了表达变化。其中包括相对分子质量为60 000的分子伴侣以及中性肽链内切酶、葡萄糖磷酸变位酶、细胞分裂蛋白、烯醇化酶、乳酸脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶、3-羟基丁酮还原酶、超氧化物歧化酶和乳酸酰谷胱甘肽裂解酶等18种蛋白表达增加,这些蛋白具有能量代谢、细胞分化、翻译和转运等各种作用。另外,有蛋白翻译延伸因子-G、Tu、Ts以及DnaK、核糖体蛋白小亚基S1P、核糖体蛋白大亚基L12P、蛋白磷酸转移酶和多糖结合转运系统等12种蛋白表达下降。在研究变异链球菌酸耐受反应蛋白表达时发现,199个细胞内外蛋白的表达发生了变化,167种蛋白中有61种蛋白与酸应激途径相关,并且在DNA的基因表达以及蛋白质多肽链的折叠和蛋白质的水解过程中起重要作用。在酸耐受环境下,变异链球菌的细胞排出质子(H^+)的能力增强。变链菌在不同环境压力(如温度、盐、氧化和饥饿)条件下生长的研究显示,在恶劣环境下,变链菌有非常复杂多样的蛋白质表达变化。

浮游细菌在黏附到牙齿表面后,即调整基因表达,并出现生物膜环境所特有的蛋白表达模式,其生理特征具有快速适应新的生长环境的能力。在变异链球菌与物质表面接触黏附时的蛋白表达研究中发现,生物膜态下有25种蛋白表达增加,8种蛋白表达下降,另有33种蛋白与黏附应激反应相关。该结果表明,生物膜态细胞最显著的变化是糖分解代谢中的某些酶合成量增加。当变异链球菌黏附于物质表面时,代谢过程发生了从蛋白合成代谢向能量合成代谢的转变。另一项研究分析变异链球菌由浮游态转化成成熟的生物膜态时的蛋白表达时发现了242种蛋白,其中有48种蛋白表达发生了变化,有4种蛋白与变异链球菌感

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

受态的维持有关系，而且这 4 种蛋白编码基因的上游存在着像 cin 盒子样的元素。

Svensater 等在同样条件下，对培养 3 天的成熟生物膜进行了研究，有 57 种蛋白表达上调，并出现了 13 种特异性蛋白；78 种蛋白下调，另有 9 种是变异链球菌在浮游状态所特有的。质谱分析差异蛋白发现，在生物膜状态下与酸合成有关的糖酵解酶被抑制，而同蛋白合成、折叠、复制相关的蛋白含量明显增加。

用高效液相-质谱对无龋以及高龋人群唾液进行分析中发现，无龋人群唾液中存在大量的磷酸肽（富脯蛋白、富组蛋白以及富酪蛋白），这些蛋白在保持牙齿的完整性方面起着重要的作用。而高龋人群唾液中肽片段的出现提示在致龋化转变过程中存在着较强的蛋白水解力。当运用双向电泳技术进一步对两组人群唾液在体外形成的菌斑蛋白成分与龋病易感性的关系进行研究，发现酸性富脯蛋白、lipocalin 蛋白、胱蛋白 SN、胱蛋白 S 的出现与无龋状态呈现明显的正相关，这些蛋白作为组织蛋白酶以及蛋白水解酶的抑制因素，可以对牙齿起到间接保护作用；而在高龋人群牙菌斑中发现了高含量的淀粉酶、免疫球蛋白 A 和乳铁蛋白。

（二） 口腔链球菌

口腔链球菌（*S. oralis*）是一种与变异链球菌相似、非变异的耐酸链球菌，在牙列最早定植，是正常牙菌斑的一部分，但与感染性心内膜炎有关。口腔链球菌在口腔内生长于一种弱酸性环境（pH 6.0 ~ 6.5），但一旦进入血流，pH 瞬间升到 7.3，这可能会刺激蛋白表达的改变并影响随后细菌定植于受损的心脏瓣膜。研究发现，pH 7.0 ~ 5.2 的酸冲击作用下，口腔链球菌的 39 种蛋白表达发生变化，指纹图谱分析显示上调的 28 种蛋白主要涉及糖酵解途径的相关酶类（甘油醛-3-磷酸脱氢酶和乳酸脱氢酶）、含有 ATP 合成酶的多肽链以及在细菌的应急反应中起作用的各种蛋白（60 000 伴侣蛋白、超氧化剂物歧化酶和 3 种 ABC 转运蛋白）。

（三） 牙龈卟啉单胞菌

牙龈卟啉单胞菌与慢性牙周炎以及菌斑中其他细菌如戈氏链球菌、放线菌属细菌共生黏附有关，表面蛋白是与黏附有关的毒力因子，对外膜蛋白的亚蛋白组学研究鉴定了 39 个外膜蛋白，深入的研究发现一些半胱氨酸蛋白酶如 RgpA、Kgp 和红细胞凝集素 HagA 等，存在不同分子量异构体，这可能与这些蛋白酶自身 C-末端切割有关。此外，还发现 RgpA 的 C-末端与脂多糖的共价结合可能是蛋白酶与牙龈卟啉单胞菌外膜结合的方式。有研究鉴定了牙龈卟啉单胞菌生物膜态相对于浮游态的蛋白表达，有 24 种蛋白上调、18 种蛋白下降。

（四） 白假丝酵母菌

白假丝酵母菌感染是口腔中常见的真菌感染，与艾滋病、抗生素滥用、义齿性口炎等密切相关。对白假丝酵母菌蛋白质组进行了广泛的研究，包括细胞壁分析、药物诱导的蛋白组改变、宿主-病原菌相互作用、免疫蛋白质组和假丝酵母菌生物膜分析等。白假丝酵母菌从酵母型向菌丝型转变可增强其组织入侵能力，然而两种形态的白假丝酵母菌蛋白组研究却没鉴定出与形态改变密切相关的蛋白，虽然蛋白丰度不同，但细胞液和细胞表面的蛋白表达谱相似。此外，用二维凝胶电泳结合免疫印迹技术发现了几个新的与血浆抗体结合的抗原，可以用来诊断系统性白假丝酵母菌病；对耐药菌株和非耐药菌株的蛋白质组比较发现，耐药株 25 种蛋白表达上调，同时 76 种蛋白表达下降，这些蛋白有望成为新的药物作用的靶点。

对真菌生物膜的研究，Mukherjee 等发现假丝酵母菌生物膜与浮游菌相比，乙醇脱氢酶 Adh1p 被显著下调。用基因敲除的突变株验证了 Adh1p 是白假丝酵母菌生物膜形成的关键

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

决定因素。破坏 Adh1p,在体外工程化口腔黏膜和鼠假丝酵母菌模型中都显著增强白假丝酵母菌生物膜形成。其他的研究也揭示随着抗氧化蛋白 Ahp1p 和 Trx1p 在生物膜模式表达增多,假丝酵母菌生物膜具有更强的抗氧化能力,因此也具有更强的药物抵抗力。

（五）口腔原虫和病毒

除此而外,口腔中病毒、原虫、螺旋体等的蛋白质组学研究业已展开。病毒蛋白组相对较小,许多蛋白可以根据基因序列进行预测。病毒蛋白质的研究倾向于病毒对宿主的影响研究,例如用 2-DE 技术分析 HeLa 细胞蛋白,显示在感染早期人鼻病毒和柯萨奇病毒的 2A 蛋白酶能裂解细胞角蛋白 8。牙龈阿米巴在破坏性牙周炎患者中发现,它破坏和攻击红细胞和白细胞。但现有公共数据库里原虫蛋白的数据非常有限,限制了原虫蛋白组的研究进展。

第八节　口腔微生物代谢组学研究

代谢组学(metabonomics 或 metabolomics)是一门对某一生物或细胞所有低分子质量代谢产物进行定性和定量分析,以监测活细胞中化学变化的科学。根据研究的对象和目的不同,代谢组学分为以下 4 个研究层次:①代谢靶标分析(target analysis):某个或某几个特定组分的分析;②代谢轮廓分析(metabolic profiling analysis):少数预设的一些代谢产物的定量分析,如某一类结构、性质相关的化合物(氨基酸、有机酸、顺二醇类)或某一代谢途径的所有中间产物或多条代谢途径的标志性组分;③代谢组学(metabolomics):在限定条件下的特定生物样品中所有代谢组分的定性和定量;④代谢指纹分析(metabolic fingerprinting analysis):不分离鉴定具体单一组分,而是对样品进行快速分类(如表型的快速鉴定)。

代谢组学和其他组学技术比较,优点在于研究对象为基因表达的终产物,样品方便易得。它将为疾病诊断和药效评价等领域提供一种方便快捷的研究手段,为生命科学的发展提供一种现代化的实验技术手段。

一、代谢组学技术平台

代谢组学对不同的实际样品以及不同类型的代谢产物分别采取不同的分析方法,力求分析生物体系(如体液和细胞)中的所有代谢产物,在整个过程中都强调尽可能地保留和反映总的代谢产物的信息。完整的代谢组学流程包括样品的采集、预处理、数据的采集和数据的分析及解释。由于实际的研究对象不同,采用的样品采集、预处理技术也就千差万别。这里仅对代谢组学研究中所用的数据采集和数据分析技术做简要的介绍。

（一）样本数据的采集技术

在完成样品的预处理后,对样品中所有代谢物进行分析鉴定是代谢组学研究的关键步骤,也是最困难和最多变的步骤。代谢物组学常用的数据采集手段主要是色谱、质谱及磁共振,色谱对样本具有良好的分离度,而质谱具有高的灵敏度和选择性,两者的结合可以获得高精细的样本代谢信息;磁共振技术对样品分析具有普适性,并且分析过程对样品不造成破坏。代谢组学分析的对象种类繁多、性质差异很大、浓度范围分布广,要对它们进行无偏向的全面分析,单一的分离分析手段难以胜任。目前常用的分离分析手段是气相色谱和质谱联用(GC-MS)、液相色谱和质谱联用(LC-MS)、毛细管电泳和质谱联用(CE-MS)、磁共振

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(NMR)以及傅里叶变换红外光谱与质谱联用(FTIR-MS)。不同的代谢组产物分析技术有其各自的特点和用途,应根据样品的特性和实验目的,选择最合适的分析方法。

1. 磁共振 磁共振技术是利用高磁场中原子核对射频辐射的吸收光谱鉴定化合物结构的分析技术,生命科学领域中常用的是氢谱(^{1}H NMR)、碳谱(^{13}C NMR)及磷谱(^{31}P NMR)3种,可用于体液或组织提取液和活体分析两大类。NMR方法具有无损伤性,不会破坏样品的结构和性质,可在接近生理条件下进行实验,并可在一定的温度和缓冲液范围内选择实验条件;可以进行实时和动态的检测;可设计多种编辑手段,实验方法灵活多样。NMR还有一个重要的特点,就是没有偏向性,对所有化合物的灵敏度是一样的。NMR谱中的化学位移、峰面积、耦合常数、弛豫时间均是解析化合物结构的依据,这使得NMR法成为目前代谢研究关注的一种方法。

NMR氢谱的谱峰与样品中各化合物的氢原子是一一对应的,所测样品中的每一个氢原子在图谱中都有其相关的谱峰,图谱中信号的相对强弱反映样品中各组分的相对含量。NMR氢谱能完成代谢产物中大多数化合物的检测,满足了代谢组学对尽可能多的化合物进行检测的目的。因此,NMR方法很适合研究代谢产物中的复杂成分。

NMR氢谱检测时样品用量少,一般只需0.3ml,测定时间为5分钟,具有快速、简便检测的特点。与色谱法比较,突出的优点是对生物样品的预处理简单,这使得NMR法更具实用性。NMR谱的无损伤特点还使其可以检测整体动物或人体特定器官细胞内的代谢物组。以氢谱(^{1}H NMR)为例,所得的^{1}H NMR谱峰与样品中各化合物的氢原子对应。根据一定的规则或与标准氢谱比照可以直接鉴定出代谢物的化学成分,信号的相对强弱则反映了各成分的相对含量。不同样品的代谢物图谱有其特质性,类似于样品的"指纹"。对这种特质性进行区分、鉴定,被称为"代谢指纹分析"(metabolic fingerprint analysis),能帮助找出机体代谢的共性与个性。

随着NMR技术的发展,以前用于固体的魔角旋转(magic angle spinning, MAS)技术被移植到液体领域,使得人们可以研究以前难以用液体NMR研究的样品,如器官组织样品。MAS技术让样品与磁场方向成54.7°旋转,从而克服了由偶极耦合(dipolar coopling)引起的线展宽、化学位移的各向异性。利用MAS技术,人们可以得到完整的组织样品高分辨谱图,样品中仅加入非常少量的D_2O而不必进行预处理,样品量只需约10mg。MAS技术的使用扩展了代谢组学研究的样品范围,同时可以更全面地对一个系统进行深入的研究。MAS技术使得NMR谱图的分辨能力明显提高,在代谢物组学的很多领域都得到了广泛的应用。

二维核磁(2D-NMR)用于代谢物组学的研究也十分有效,可提高分辨力,清楚准确地反映出各种复杂分子结构中各种原子之间的链接、耦合及空间信息。可以通过同核^{1}H-^{1}H全相关谱(total correlation spectroscopy, TOCSY)研究分子结构中各种氢的相关关系,再通过异核相关谱(heteronuclear multipe quantum coherence, HMQC; heteronuclear multiple bond coherence, HMBC)来研究分子结构中碳与氢的互相键合与耦合关系,还可以通过空间效应谱(two-dimensions nuclear overhauser effect correlation spectroscopy, NOESY)来研究更为复杂的分子空间立体结构。

采用^{13}C-NMR技术,比^{1}H-NMR有较高的分辨率和灵敏度。因此,NMR仍是当前代谢物组学研究的主要技术。但是,NMR的分辨能力毕竟有限,灵敏度也不高,对于浓度相差很大

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

的成分也无法同时分析，在复杂系统分析中应用尚有难度。体液所含组分众多，得到的核磁谱图往往很复杂，单独采用一种 NMR 很难对复杂的产物组分进行指认，因此，需要将 NMR 分析手段与其他各种色谱技术进行联用，才能成为代谢物组学研究的强大的手段。

2. 色谱技术　色谱技术因其卓越的分离性能、高灵敏度已被广泛用于复杂体系（如体液）中的靶标分析（如标记物分析）。色谱技术用于代谢组学的研究，存在的主要问题是大量色谱峰的识别以及方法的重现性问题。Pham-Tuan 等全面考察了 HPLC 用于生物样品高通量的代谢物组学研究，提出一种利用短的整体柱配以大流速、快梯度洗脱的分析方法。该方法能快速分析体液样品，得到多信息代谢指纹图谱，且容易与 MS 联用，显示了液相色谱利用新发展的技术实现高通量分析的潜力。

3. 质谱　色质联用质谱技术是将离子化的原子、分子或分子碎片按质量或是质荷比（m/z）大小顺序排列成图谱，并在此基础上，进行物质的定性或定量分析。质谱图中每个峰所代表的化合物的分子结构可以通过其碎片峰的类型和质荷比（m/z）结合有关质谱数据库来进行鉴定，其含量可以通过峰面积的大小来测定。质谱法具有如下优点：①超微量；②快速（数分钟内完成一次测试）；③能同时提供分析样品的相对分子质量信息和结构信息；④既能进行定性分析，又能进行定量分析；⑤能有效地与各种色谱法在线联用，成为分析复杂体系的有力手段。MS 的选择性和灵敏度都较好，但存在离子化程度和基质干扰等问题，离子化过程存在的电离歧视效应与代谢物组学的研究思想存在矛盾，是质谱方法需要迫切解决的技术瓶颈。

色谱是最常用和有效的分离分析工具，其与质谱的联用可以完成从成分分离到鉴定的工作。MS 与各种色谱技术的联用使得质谱技术在代谢物组学的研究中起着十分重要的作用，如液质联用、气质联用等对于分离代谢产物及分析复杂生物基质中代谢产物的结构有着 NMR 所不具有的优势。GC/MS 和 LC/MS 可以同时检测出数百种化合物，包括糖类、有机酸、氨基酸、脂肪酸等和大量不同的次生代谢物。

GC/MS 的优势在于能够提供较高的分辨率和检测灵敏度，且相对较为经济，并且有可供参考、比较的标准谱图库，可方便地得到待分析代谢组分的定性结果。GC/MS 分析时，首先需对样品进行衍生化处理，以增加样品的稳定性和挥发性。GC/MS 只能对其中的挥发性组分实现直接分析，为此不能得到体系中难挥发的大多数代谢组分的信息，也无法分析膜、脂等热不稳定性的物质和相对分子质量较大的代谢产物。

LC/MS 采用 LC 作为其主要的分离手段，增强了其分辨能力，与 MS 或 MS/MS 的联用可以得到代谢组分的结构信息。它与 GC 相比预处理相对简单；在进样前不需进行衍生化处理，适合那些不稳定、不易衍生化、不易挥发和相对分子质量较大的化合物。

4. 傅立叶变换红外光谱质谱联用　傅立叶变换红外光谱质谱（FTIR/MS）联用也被应用于代谢组学分析。FTIR 主要测定样品的红外吸收频率和强度，可以识别各个成分。FTIR 具有扫描速度快、光通量大、高分辨率、高信噪比及测定光谱范围宽的特点，但不可区分异构物，且组分片段和一些络合离样品造成破坏，但灵敏度比 MS 差，不适合于痕量化合物的鉴定。Aharoni 等利用高分辨率的 FTIR/MS 联用仪器对凤梨、草莓组织进行了分析，根据不同的质荷比找到了 5844 个不同质量的物质，并对化合物中高含量的元素的精确质量测定估计了其中 1/2 以上物质的化学结构式。结果表明，在草莓的不同组织中都含有多种类的初生代谢物（如氨基酸、脂肪酸和碳水化合物）及次生代谢物（如类黄酮和萜类化合物）。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）样本数据的分析技术

代谢组学研究得到的是大量的、多维的信息。为了充分抽提所得到的数据中的潜在信息，往往需要运用多种数据分析技术，将多维、分散的数据进行总结、分类及判别分析，寻找数据间的定性、定量关系，挖掘数据中蕴藏的生物学意义，以便阐述其与机体代谢间的关系。为了充分利用代谢组学产生的有用信息，通常需要采用化学计量学方法。

目前，分析数据的主要方法有化学模式识别和基于理论的系统鉴定法，前者主要包括无监督方法（如聚类分析、主成分分析、自组织图等）和有监督方法（如非线性回归、判别式功能分析、遗传算法、遗传编程、前馈神经网络、支持载体机器、酵母共反应功能分析等），后者包括非线性动力学、化学动力学和代谢控制分析。在此主要介绍化学模式识别（chemical pattern recognition）方法。

所谓模式是指事物或事件的各种可测量的和不可测量的集合，而人们对客观世界的认识就是对模式的识别。模式识别是鉴于数据矩阵提供的信息，用数学方法识别具有一定模式的样本和变量，其功能是对样本进行分类或判别。简言之，就是研究“物以类聚”的一种方法。比如医生给患者看病，通过各种方式了解病情，根据检查结果作出诊断，就是模式识别。

1. 数据预处理　代谢组学研究所得的实验数据，通常可以排列为一个 m 行 n 列的矩阵 X。行表示 m 个对象（样本），列表示 n 个特征。对象可以是血清、尿液、胆汁等，而这些对象的特征是通过仪器检测分析所得的谱图、结构特征、物理性质等。

$$X=\begin{bmatrix} x_{11}, & x_{12}, & \cdots & x_{1n} \\ x_{21}, & x_{22}, & \cdots & x_{2n} \\ x_{m1}, & x_{m2}, & \cdots & x_{mn} \end{bmatrix}$$

每个对象的数据为一个 n 维矢量。数据间不仅量纲可能不同，其绝对值大小也可能会有几个数量级之差。数据未经处理而直接用于统计分析，易于突出大数据属性的作用而遗失小数据信息。为了避免量纲和数据均值不同对数据分析造成的影响，通常应用标度化方法使各变量的变化幅度处于同一水平，即对数据集进行预处理。

数据预处理（data preprocessing）首先需要考察数据的完整性，通常遗漏的数据用行或列的平均值来代替，这并不妨碍利用数学方法进行数据分析。如果某特征参数与其他参数具有高度相关性，对于冗余的参数、常数参数等，可从原始数据中删除。下面介绍几种常用的标度化方法。

（1）值域调整：

$$x_{ij,\text{new}}=\frac{x_{ij,\text{old}}-x_{j,\min}}{x_{j,\max}-x_{j,\min}} \qquad 0\leqslant x_{ij},\text{new}\leqslant 1$$

式中，x_{ij},new 表示第 i 个样本经换算后所得的第 j 分量；x_{ij},old 表示第 i 个样本的第 j 分量；$x_{j,\min}$ 表示原有第 j 分量的最小值；$x_{j,\max}$ 表示原有第 j 分量的最大值。

值域调整（range scaling）法的缺点是，若数据集中有一个数值很大，则其余各数据间差值不明显。

（2）自标度化：

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

$$x_{ij,\text{new}}=\frac{x_{ij,\text{old}}-\overline{x_j}}{s_j}$$

$$s_j=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_{ij}-\overline{x_j})^2}{n-1}}$$

式中，$\overline{x_j}$表示变量j的均值；s_j表示变量j的标准差；n表示样本的数目。

自标度化（autosealing）将数据的均值调整为0，标准差调整为1，向量的模长调整为$\sqrt{n-1}$。

（3）标准化：标准化（normalization）预处理的方法很多，对于不同的仪器应用不同的方法。在某些情况下，可将一个数据向量的模长标准化为1，即：

$$x_{ij,\text{new}}=\frac{x_{ij,\text{old}}}{\| x_j \|}$$

$$\| x_j \| =\sqrt{x_{1j}^2+x_{2j}^2+\cdots+x_{nj}^2}$$

（4）对数变换：

$$x_{ij,\text{new}}=\lg(x_{ij})\qquad xi_j>0$$

当变量的动态范围较大，如相差几个数量级时，可采用对数变换（logarithmic transformation）法。

2. 数据分析

（1）无监督法：无监督方法是指利用聚类分析法或通过将高维数据投影到低维空间并对分析数据进行分组，而不需要已知类别关系的样本指导，也称为无管理识别方法。代谢组学中的无监督方法用于从原始谱图信息或预处理后的数据中对样本进行归类，并采用相应的可视化技术直观地表达出来。该方法将得到的分类信息与样本的原始信息进行比较，建立代谢产物与原始信息之间的联系，筛选与原始信息相关的标记物，进而考察其中的代谢途径。无监督方法主要包括主成分分析、系统聚类分析、非线性映射法和自组织图等。

（2）有监督：有监督方法需要有一个训练集（training set），在训练集中，各样本类别是已知的，如一些样本属于A类，另一些样本属于B类，将训练集中样本的类别输入计算机，让计算机通过训练或学习掌握一定的识别规律后，再去预测未知样本的类别，也称为有管理识别方法。

训练集中是由为建立模型而被分析的数据元组形成，训练集中的单个元组称为训练样本，每个训练样本有一个类别标记。在代谢组学中，有监督方法用于建立类别间的数学模型，使各类样本间达到最大分离，并利用建立的多参数模型对未知的样本进行预测。在这种方法中经常需要建立用来确认样本归类的确认集（validation set）和用来测试模型性能的测试集（test set）。

所谓测试集是从训练集以外独立采样，主要用于测试分类模型的准确度，对类标号未知的新数据进行分类。确认集是从训练集和测试集以外独立采样，主要用于帮助做设计决策，确认样本类别。数据集包括训练集、测试集和确认集。有监督方法主要包括偏最小二乘法、

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

线性判别式法、SIMCA 和人工神经网络等。

二、代谢组学方法在微生物领域里的应用

作为新兴的分子生物学技术，代谢组学技术已广泛应用于生命科学的各个研究领域。在微生物领域研究中，该技术也取得了较大的进步。特别是在细菌和真菌的代谢路径、代谢产物变化的研究以及对原位生物膜的研究等方面均取得了较大的成功，为研究相关微生物生理病理机制提供了重要的研究手段。

（一）微生物代谢组学研究的实验方案

经典的微生物分类方法多根据微生物形态学以及对不同底物的代谢情况进行表型分类。随着分子生物学的突飞猛进，基因型分类方法如 16S rDNA 测序、DNA 杂交以及 PCR 指纹图谱等方法得到了广泛应用。而微生物的基因数据中包含一些功能未知的基因，基于基因信息分析得到的代谢途径显然不完全，迫切需要微生物代谢组学策略共同译解其全部基因功能。

微生物如大肠埃希菌（*E. coli*）的全部代谢产物仅占细胞干重的 3% ~5%，但化学结构和生物活性的多样性难以估计，是一般合成化合物和组合化学产物所不能比拟的，其范围从小的无机离子到疏水性的脂质及复杂的天然产物，浓度范围跨越 9 个数量级（从 pmol 到 mmol）。微生物代谢组学是指在细胞生长或生长循环某一特定时间点，以无偏、可重现的方式同时定性和定量分析细胞内、外存在的全部低分子量代谢产物。微生物代谢组学研究的实验方案包括从生物量培养、灭活和代谢产物的提取到代谢物的定量分析几个部分。

1. 生物量培养技术　微生物代谢组学研究所需要的大量菌体可通过在控制培养环境下的生物反应器内培养得到。为建立标准的和可重复的参考培养条件，需要严格控制生物反应器的环境：温度、pH、培养液组成及溶解的氧气和二氧化碳浓度。近期，代谢组学领域的大多数研究者倾向于应用生物反应器连续培养操作模式。最近研制出一种滤器培养微生物细胞的方法，应用于快速收集细胞。该方法以仅含琼脂的平板为支持介质，加液体培养基于其上；然后将过滤并黏附有目标微生物的滤器置于琼脂平板内的液体培养基中培养。取样时，直接把滤器置于淬灭剂中即可。

2. 灭活及菌体的获得　灭活的目的是让细胞内的酶失活，“冻结”代谢物的轮廓。传统的代谢产物活性快速灭活方式是通过瞬间改变样品温度或 pH 值完成的。液氮灭活法也是人们常使用的一种灭活方法。该法将样品直接投入液氮，通过迅速降低细胞内温度来抑制酶活性，冰上解冻后收集菌体。实验中发现，灭活过程中多种细菌会有代谢物丢失，且泄漏的程度随淬灭时间、甲醇浓度的增加，淬灭温度的降低进一步加剧。如果在淬灭剂中加入缓冲液、加快离心速度、减少淬灭时间可减轻泄漏程度。而通过对真核生物灭活过程的对比实验，推断出灭活过程中代谢物的泄漏可能依赖于细胞壁和膜的结构。

3. 细胞内代谢产物的提取　代谢反应通过灭活被捕获后，代谢产物就需要从细胞中提取出来。传统的液液萃取技术应用得最多。萃取应遵循的原则是：

（1）以适当的回收率从细胞中提取最大量的代谢产物。

（2）代谢产物不应该遭遇任何物理和化学修饰，降解应控制在最小范围内。

（3）防止代谢产物丢失和破坏。

有机溶剂中甲醇无疑是到目前为止微生物代谢组学分析中最佳的萃取溶剂。Winder 等

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

研究结果表明,60%的冷甲醇(-48℃)溶液是最适当的灭活代谢反应和提取溶剂。

在液液萃取的诸多实验中,提取液中均加入缓冲液以保证在中性条件下进行萃取,从而确保代谢物稳定。但有研究显示在酸性环境下的提取可获得较少细胞渗漏。也有人采用无盐的甘氨酸缓冲液以减少残留的盐对质谱分析产生离子抑制效应。

除液液萃取之外,加速溶剂萃取、超声波辅助萃取、基质固相分散萃取、微波辅助萃取等一些比较新的提取方法在微生物代谢物的研究中也有广泛的应用前景。

(二) 微生物代谢组学方法的应用

代谢组学检测方法操作简单并易获得微生物的生物化学信息,加上快速的自动分析鉴定系统,使其在微生物领域中有很好的应用前景。

1. 在细菌研究中的应用

(1) 应用于细菌鉴定:传统的细菌鉴定方法依靠从临床分离单一的细菌,进行其形态学、生物化学和血清学鉴定,鉴定过程耗时耗力且一些细菌只能鉴定到属。一些菌株的临床致病性不同却有相似遗传背景,传统的细菌鉴定方法无法进行鉴别。代谢组学技术可普遍应用于细菌和细菌生态学,观察其生理和生化特征,区分和鉴定不同功能及生物学特性的菌株或菌种。Jacob 等用 NMR 技术分析蜡样芽胞杆菌的代谢物谱图并进行模式识别时证明,用代谢组学方法,在生理表现型的基础上可区分其病原株和无毒株。Bourne 等对葡萄球菌属和链球菌属的312株菌株进行代谢组学的分析鉴定,其结果与传统鉴定方法的相符率达到92%。

(2) 应用于细菌代谢路径:准确的代谢路径分析需要对酶进行活性化学反应计量法、生物信息法等全面测定。Fiaux 等用^{13}C标记的和未标记的葡萄糖混合物观察大肠埃希菌的微需氧代谢时发现,丙酮酸盐的C_1~C_2链断裂、特征性丁酮二酸盐(通过磷酸烯醇丙酮酸盐羧化作用生成)和甲酸盐形成,证实了微需氧菌的代谢活动与厌氧和需氧菌明显不同。Boersma 等通过^{19}F-NMR 发现了微生物中氟苯异苯酚和羟基苯的代谢路径,并推测该路径可能与代谢型的表达相联系。Volker 等用代谢流分析技术结合核素标记方法,分析谷氨酸棒状杆菌的中心代谢路径,建立其代谢网络模型和预测模型。Mogens 等对乳酸菌的核苷酸代谢及其调控机制进行了研究,旨在提供乳酸菌代谢的生理学和遗传学概貌。

(3) 应用于细菌生化反应分析:Rager 等在观察类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas Shigelloides*)代谢甘露糖的过程中用^{31}P-NMR 分析细胞成分时发现,在含甘露糖的培养基中该菌生长缓慢,因为6-磷酸甘露糖的毒性而不是能量的逐渐消耗。Wolin 等在肠道细菌底物的不同位点用^{13}C标记葡萄糖,用 NMR 技术测定由其转化成的^{13}C醋酸盐和乳酸盐,对母乳喂养的婴儿肠道内的双歧杆菌的活性进行分析,评估双歧杆菌在结肠生态系统中的重要性。结果发现,与人工喂养的婴儿相比,以母乳喂养的婴儿的肠道中双歧杆菌更易于移居定植,且与婴儿腹泻有关。Lelait 等利用^{13}C-NMR 技术分析黏液真杆菌的碳代谢特性时发现,黏液真杆菌中氨基酸的生物合成途径与其他微生物的生化反应明显不同,黏液真杆菌通过乙酰辅酶 A、丙酮酸和三羧酸循环合成碳。

(4) 应用于原位生物膜研究中:细菌的表型特征因生物膜厚度、氧气、营养物质、酸碱度等而不同。传统的侵入式提取样本的方法不能动态、连续地检测细菌代谢变化,因此不能反映与深度相关的生物膜中的细菌代谢状况。Paul 等采用平坦的膜作支持物,结合循环流动的生长和反应体系分析革兰阴性需氧菌希瓦菌菌种沙雷菌(*Shewanella oneidensis*)的成熟生

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

物膜，并用^{13}C标记乳酸盐，通过代谢物谱图发现延胡酸盐利用和琥珀酸盐生成，证实延胡酸盐是最终电子接受者，生物膜一些区域内有低溶解度氧存在。

2. 在真菌研究中的应用　自20世纪末开始，Oliver等学者提出了通过对代谢产物的数量和质量分析来评估酵母基因的遗传功能及其冗余度的必要性，且利用傅立叶变换红外光谱对酵母的代谢产物进行研究发现，代谢酶控制细胞内的代谢动力学，基因未必伴随代谢物变化，代谢酶对代谢的调控作用非常明显。Paulik等研究了酿酒酵母的肌醇磷酸盐代谢，从中发现肌醇磷酸盐的信号和细胞功能之间存在的联系。Daisuke等利用代谢物差异筛选分析法（metabolomic differential display analysis）对白腐丝状真菌（*white-rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*）进行了研究，即应用GC-MS联合分析该菌细胞的代谢提取物，从代谢物谱图中测量出183个峰并分离53种化合物，其中藜芦醇和苏氨酸被鉴定出来作为氧应激代谢物的标志物。Granato等应用代谢物数据和^{13}C-NMR技术对酿酒酵母的代谢物甘氨酸进行分析，发现了甘氨酸分解代谢的新途径，证实了代谢组学技术和核素标记分析方法在代谢路径再建研究中潜力巨大。Himmelreicha等用基于NMR的代谢组学方法成功将白假丝酵母菌和都柏林假丝酵母菌进行了区分，其中，96%的代谢成分被准确区分出来，证实了两者之间存在生化差别。表明代谢组学是鉴别相似菌落的迅速有效方法。

3. 微生物分类及筛选研究　经典的微生物分类方法多根据微生物形态学以及对不同底物的代谢情况进行表型分类。代谢谱分析方法（metabolic profiling）可以通过检测胞外代谢物来加以鉴别。常用的胞外代谢物检测方法为样品衍生化后进行GC-MS分析、薄层层析或HPLC-MS分析，最后通过特征峰比对进行分类。Bundy等采用NMR分析代谢谱成功地区分开临床病理来源以及实验室来源的不同杆菌（bacillus cereus）。除了表型分类外，代谢产物数据可以应用于突变体的筛选。

在传统研究中的沉默突变体（即未发生明显的表型变化的突变体）内，突变基因可能导致了某些代谢途径发生变化，通过代谢快照（metabolic snap shot）可以发现该突变体并研究相应基因的功能。Soga等用CE-MS系统研究了枯草杆菌在芽胞发生过程中的代谢谱的变化过程，识别出胞内1692种代谢物，并鉴别出其中的150种代谢物。

4. 发酵工艺的监控和优化　发酵工艺的监控和优化需要检测大量的参数，利用代谢组学研究工具可以减少实验数量、提高检测通量，并有助于揭示发酵过程的生化网络机制，进而优化工艺过程。Buchholz等采用连续采样的方法研究了大肠埃希菌在发酵过程中的代谢网络的动力学变化，他们在无葡萄糖培养液培养出的大肠埃希菌中加入葡萄糖，并迅速混匀，按每秒4~5次的频率连续取样。利用酶学分析、HPLC/LC-MS等手段监测样品中多达30种以上的代谢物、核苷以及辅酶，从而解析了葡萄糖以及甘油的代谢途径和底物摄取体系。

通过统计学分析建模，发现在接触葡萄糖底物后的15~25秒范围内，大肠埃希菌体内发生的葡萄糖代谢物变化与经典生化途径相符，但随后的过程则与经典途径不符，推测可能存在新的未知调控步骤。Takors认为，通过上述代谢动力学研究，掌握代谢途径及网络中的关键参数，将直接有利于代谢工程的优化，包括菌株的理性优化以及发酵参数的调控。Dalluge等利用LC-MS-MS方法监控发酵过程中的氨基酸谱纹，实现对整个发酵系统的高通量快速监控，而接下来的研究将考虑缩小氨基酸监测范围，通过少数几个关键氨基酸的监测实现对整个发酵系统状况的监控。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

5. 环境微生物研究　微生物降解是环境中去除污染物的主要途径。深入了解污染物在微生物内的代谢途径，将有助于人们优化生物降解的条件，从而实现快速的生物修复。这些代谢中间体大都通过萃取、分析方法进行逐个研究，并借助专家经验拟合出代谢途径，其动力学过程亦很少触及。代谢组学方法的采用有可能改变这一现状。

Boersma 等采用代谢组学方法研究氟代酚的微生物降解途径。氟代化合物具有特殊的 ^{19}F 磁共振属性，^{19}F 的磁共振灵敏度与 ^{1}H 核相近；由于生物体内无内源性 ^{19}F 核磁信号，因而无本底干扰。所有 ^{19}F 核磁信号均可归结于异生素及其代谢物。因此，借助磁共振技术可以更方便地研究含氟化合物的代谢中间体。根据总代谢物的磁共振图谱，推测出红球菌内羟化酶在不同的取代位（1、2、3 三种不同的取代数量）羟基化氟代酚，然后再通过儿茶酚内位双加氧酶开环形成氟代黏糠酸的代谢过程。此外，他们还首次检测到开环后的下游代谢物，即通过氯黏糠酸异构酶生成氟代黏糠酸内酯以及氟代马来酸等中间代谢物。Narasimhan 等利用根际代谢物组（rhizosphere metabolomics）方法，阐释了植物分泌物对根际微生物降解多氯代酚（PCB）的作用机制。结果表明植物根际分泌的次级代谢物促进降解菌的繁衍增殖，从而促进了污染物的降解。

三、代谢组学方法在口腔微生物及口腔疾病领域里的应用

龋病是发生牙齿硬组织的慢性细菌性疾病，是口腔最常见的疾病之一，被 WHO 列为当代危害人类健康的三大非传染性疾病之一。大量实验证明：龋病与细菌有着密切的关系，并且不同的细菌可引起不同程度的龋损。

（一）致龋微生物研究

近年的无菌鼠实验模型研究结果证实变异链球菌、唾液链球菌、血链球菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌和黏性放线菌都可引起实验性龋病，只是其致龋性和致龋部位存在差异。口腔疾病研究国家重点实验室应用基于 NMR 的代谢组学分析方法对血链球菌（*Streptococcus sanguis*，*S. sanguis*）、表兄链球菌（*Streptococcus sobrinus*，*S. sobrinus*）及嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*，*L. acidophilus*）的细胞外液进行采集分析，描绘了菌株的特征代谢图谱，结合多元统计分析显示：菌株的胞外代谢产物具有较好的成簇性及特征性，表明了从代谢产物的角度可以较好区分不同的菌株，为深入研究口腔致龋菌的代谢途径提供了理论依据。

（二）口腔微生态系统

口腔疾病，如龋病、牙周病、黏膜疾病甚至口腔肿瘤的发生、发展不仅与机体全身状况（如基因、蛋白水平的差异）有关，还与口腔这一特殊器官的小环境的变化密切相关。研究口腔微生态系统（唾液、菌斑、温度和酸碱度）的代谢变化与口腔疾病的相关性，记录环境变化引起的代谢变化特征图，从代谢角度区别内源性或外源性致病因素，对口腔疾病的诊断和治疗具有重要意义。

通过对口腔牙菌斑中常见的衣氏放线菌（*Actinomyces naeslundii*，*A. naeslundii*）和内氏放线菌（*Actinomyces israelii*，*A. israelii*）稳定期的胞外代谢产物的核磁谱图进行比较，探讨采用该方法寻找特征性代谢产物从而鉴定口腔放线菌的方法，探索研究放线菌在牙菌斑中诱发根面龋的致病机制。牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*，*P. gingivalis*）、中间普氏菌（*Prevotella intermedia*，*P. intermedia*）和具核梭杆菌（*Fusobacterium nucleatum*，*F. nucleatum*）是牙周疾病重要的致病菌，其快速有效的鉴别对病因的研究及疾病的治疗十分重要。采用基

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

于 NMR 的高通量代谢组学方法可以有效快速区分各致病菌的代谢产物。

口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC)是头颈部常见的恶性肿瘤,在口腔鳞癌发生发展过程中,由于肿瘤细胞基因组改变所产生的物质代谢异常以及因其他原因引起的正常物质代谢的异常,导致一些肿瘤相关和(或)肿瘤特异的小分子蛋白质或肽释放到体液和排泄物中,引起机体微环境发生改变进而促进了肿瘤的进一步发展。

利用磁共振对体液和排泄物进行^{1}H-NMR 谱检测,从而获得肿瘤本身或刺激机体产生的代谢变化图谱。描绘口腔鳞癌、口腔白斑血浆代谢的特征性指纹图对研究肿瘤在机体内的代谢及诱发机体产生的相关代谢,两种疾病在代谢方面的关联性等具有重要意义。采用基于磁共振的代谢组学方法对口腔鳞癌患者、白斑患者和正常人群的血浆代谢产物进行检测分析,评价该方法的可行性及为进一步找寻口腔鳞癌的特征性代谢产物奠定基础。研究结果显示,该方法可以从正常人群的血浆中较好地区分出口腔鳞癌患者血浆,对口腔鳞癌患者血浆代谢产物中有变化的代谢产物进行了化学位移值的归属,有助于进一步确定口腔鳞癌患者特征性代谢产物。上海交通大学通过对口腔鳞癌患者、白斑患者及口腔扁平苔藓患者的唾液进行高效液相-质谱(HPLC-MS)代谢组学分析,找寻其有效特征性代谢产物,尝试建立临床诊断模型,研究显示基于 HPLC-MS 代谢组学分析可以较好区分三类疾病。

先天性唇腭裂是口腔颌面部常见的一种先天性发育畸形,是一个复杂的、由遗传和环境因素相互作用所致的多基因多因素遗传性疾病,目前观点倾向于继发的基因-环境的相互作用造成的。对唇腭裂疾病的代谢组学研究旨在描绘唇腭裂儿童的代谢指纹图的同时,模拟建立在外环境致畸作用下胚胎发育的动物模型,初步探讨其可能存在的代谢机制及寻找到具有相对特征性的生物标记物。通过应用^{1}H-NMR 采集非综合征性唇腭裂患儿的血浆样本,结合主成分分析显示。非综合征性唇腭裂患儿和正常人的血浆代谢存在明显差异,非综合征性唇腭裂患者血浆代谢产物以缬氨酸和三羟丁酸 γ 甲基类物质为主,而正常人血浆代谢产物则以精氨酸为主。对 E17.5 天的地塞米松诱导腭裂组及正常的孕鼠血浆分别进行了 NMR 代谢分析,结合化学计量学及胚胎形态学分析,结果显示:两组样本的代谢产物中炔基化合物、CH-基氨基酸及糖基化合物群有明显差异。该研究充分证明了采用基于 NMR 代谢组学分析方法对孕鼠血浆进行分析建模可有效反映胎鼠腭胚突发育变化,并可以将带有异常腭裂胚胎的孕鼠区分出来,证实了基于回归方程建立的甄别腭裂发生的预测模型是有效的。同期的另一组实验也表明,维生素 B 族在地塞米松诱导腭裂的过程中具有拮抗作用。

四、最新研究方向及展望

代谢组学是一个新兴的研究领域,其相关的理论与技术还有待完善。目前代谢组学存在的问题主要有以下几方面:

1. 代谢产物分离手段有限,无法达到同时对所有代谢物进行分析的能力。
2. 缺乏有效的数据分析手段将所得的全部数据进行分析和解释。
3. 标准代谢组学数据库还未建立。
4. 如何有效解决代谢组学与基因组学、转录组学和蛋白质组学技术的联用问题。

代谢状态变化迅速,影响因素多,给个体化研究带来很大的困难,建立代谢组学研究的数据库就显得非常重要。通过采用同样的实验方案,将所得的代谢轮廓与数据库中的代谢轮廓进行比对,逐渐建立代谢产物数据库。数据库的建立可从以下几方面考虑:

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

1. 储存有详细的代谢物轮廓，包含所有原始数据和详尽的代谢组学数据的数据库。

2. 基于单种类的数据库，其中储存有相对简单的代谢物轮廓。

3. 储存有在不同生理状态下不同种类的复杂的代谢物轮廓数据的数据库。

4. 罗列有各种生物种属所有已知代谢物数据信息的数据库，采用适当的数据库，能包含代谢物随时空变化的信息。

5. 编辑确定的生化信息的数据库。

6. 整合基因组和代谢组数据以便能构造代谢数据模型的数据库。

随着研究的深入，代谢组学分析系统的硬件、软件技术都将进一步提高，并朝着整合化、自动化和高通量方向发展。代谢组学研究在药物安全性评价、药理学、环境评价、营养分析、功能基因组研究、疾病预测和诊断等领域将发挥越来越重要的作用。

（张平　李明云　薛晶　周京琳　何金枝　李燕　李雨庆　梁景平　王智）

参 考 文 献

1. 肖丽英，肖晓蓉．实用口腔微生物学图谱．北京：人民卫生出版社，2009
2. 王人可．变性梯度凝胶电泳在口腔微生物研究中的扩展应用．四川大学，博士学位论文，2011
3. 周学东，施文元．微生物生物膜与感染．北京：人民卫生出版社，2012
4. 曾郑祥，周学东．变异链球菌的比较蛋白质组学研究进展．国际口腔医学杂志，2010，37：477-480
5. 梁景平．生物膜蛋白质组学研究对阐述龋病机制的意义．中华口腔医学杂志，2007，42：592-594
6. 赵楠，王桂媛，王玲姝，等．蛋白质组学关键技术研究进展．生物技术通讯，2011，22：580-583
7. 周方方，吴正钧，艾连中，等．蛋白组学技术在乳酸菌环境胁迫应激研究中的应用．食品与发酵工业，2012，38：101-106
8. 熊萍，周京琳，肖丽英，等．变异链球菌、血链球菌及嗜酸乳杆菌代谢组学鉴定的初步研究．华西口腔医学杂志，2008，26：537-540
9. Nakatsu CH. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. Soil Sci Soc Am J, 2007, 71: 562-571
10. Shen J, Zhang B, Wei G, et al. Molecular profiling of the *Clostridium leptum* subgroup in human fecal microflora by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. Appl Environ Microbiol, 2006, 72: 5232-5238
11. Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, et al. Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Oral Microbiol Immunol, 2007, 22: 14-18
12. Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. Nat Rev Microbiol, 2008, 6: 339-348
13. Wagner M. Single-cell ecophysiology of microbes as revealed by Raman microspectroscopy or secondary ion mass spectrometry imaging. Annu Rev Microbiol, 2009, 63: 411-429
14. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. The human oral microbiome. J Bacteriol, 2010, 192: 5002-5017
15. Albandar JM, Khattab R, Monem F, et al. The subgingival microbiota of Papillon-Lefèvre syndrome. J Periodontol, 2012, 83: 902-908
16. Tanner AC, Kent RL Jr, Holgerson PL, et al. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. J Dent Res, 2011, 90: 1298-1305
17. Torlakovic L, Klepac-Ceraj V, Ogaard B, et al. Microbial community succession on developing lesions on human

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

enamel. J Oral Microbiol,2012,4

18. Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing. Nat Biotechnol,2008,26:1117-1124
19. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clin Chem,2009,55:641-658
20. Nasidze I, Li J, Quinque D, et al. Global diversity in the human salivary microbiome. Genome Res,2009,19:636-643
21. Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? J Clin Periodontol,2011,38:7-16
22. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proc Natl Acad Sci U S A,2010,107:11971-11975
23. Yang F, Zeng X, Ning K, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. ISME J,2012,6:1-10
24. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, et al. The oral metagenome in health and disease. ISME J,2012,6:46-56
25. Özok AR, Persoon IF, Huse SM, et al. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. Int Endod J,2012,45:530-541
26. Koren O, Spor A, Felin J, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A,2011,108:4592-4598
27. Pushalkar S, Mane SP, Ji X, et al. Microbial diversity in saliva of oral squamous cell carcinoma. FEMS Immunol Med Microbiol,2011,61:269-277
28. Napeñas JJ, Brennan MT, Coleman S, et al. Molecular methodology to assess the impact of cancer chemotherapy on the oral bacterial flora: a pilot study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,2010,109:554-560
29. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, et al. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. J Dent Res,2000,79:21-27
30. Hope CK, Wilson M. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. J Microbiol Methods,2006,66:390-398
31. Adav SS, Lin JC, Yang Z, et al. Stereological assessment of extracellular polymeric substances, exo-enzymes, and specific bacterial strains in bioaggregates using fluorescence experiments. Biotechnol Adv,2010,28:255-280
32. Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, et al. Unraveling the resistance of microbial biofilms: has proteomics been helpful? Proteomics,2012,12:651-665
33. Ang CS, Veith PD, Dashper SG, et al. Application of 160/180 reverse proteolytic labeling to determine the effect of biofilm culture on the cell envelope proteome of *Porphyromonas gingivalis* W50. Proteomics,2008,8:1645-1660
34. Kuboniwa M, Hendrickson EL, Xia Q, et al. Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. BMC Microbiol,2009,9:98
35. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, et al. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. J Proteomics,2010,73:2064-2077
36. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature,2003,422:198-207
37. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. Nature,2008,455:1054-1056
38. Lacroix V, Cottret L, Thébault P, et al. An introduction to metabolic networks and their structural analysis. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform,2008,5:594-617

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

39. Zhao X, Fritsche J, Wang J, et al. Metabonomic fingerprints of fasting plasma and spot urine reveal human pre-diabetic metabolic traits. Metabolomics, 2010, 6: 362-374
40. Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. J Biol Chem, 2011, 286: 25435-25442
41. Smilde AK, Westerhuis JA, Hoefsloot HC, et al. Dynamic metabolomic data analysis: a tutorial review. Metabolomics, 2010, 6: 3-17
42. van Gulik WM. Fast sampling for quantitative microbial metabolomics. Curr Opin Biotechnol, 2010, 21: 27-34
43. Winder CL, Dunn WB, Schuler S, et al. Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. Anal Chem, 2008, 80: 2939-2948

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注